

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

REC'D 04 JAN 2005

WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 46 487.5

Anmeldetag: 02. Oktober 2003

Anmelder/Inhaber: TransMIT Gesellschaft für Technologietransfer mbH,
35394 Giessen/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung eines Zell und/oder Gewe-
be- und/oder Krankheitsphasen-spezifischen
Arzneimittels

IPC: C 12 N, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 2. November 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Leiang

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY



7

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Zell-

- 5 und/oder Gewebe- und/oder Krankheitsphasen-spezifischen Arzneimittels gegen chronische Entzündungserkrankungen.

Dabei werden Krankheits-, Zelltyp-, Gewebe- und/oder Stadienspezifischen Proteine und Nukleinsäuren hinsichtlich ihres geänderten Expressionsmusters identifiziert und die entsprechenden Nukleinsäuren als mögliche Angriffsziele für DNA-

- 10 zyme oder siRNA analysiert. Es folgt ein Design von aktiven spezifischen DNAzymen und siRNA, die an die Zielsequenz binden und diese spalten, so dass ein Arzneimittel gegen chronische Entzündungserkrankungen und Autoimmunerkrankungen zur Verfügung steht.

15

Anzahl anhängende Figuren: 11

An.139/Renz/Sel

Patentanmeldung

Erfinder: Dr. Serdar Sel
Bergerweg 1
5 35043 Marburg

10 Prof. Dr. Harald Renz
Am Vogelherd 6C
35043 Marburg-Cappel

15

Verfahren zur Herstellung eines Zell- und/oder Gewebe- und/oder Krankheitsphasen-spezifischen Arzneimittels

20 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Zell- und/oder Gewebe- und/oder Krankheitsphasen-spezifischen Arzneimittels, das zur Behandlung von chronischen Entzündungen geeignet ist.

An.139/Renz/Sel

Hintergrund der Erfindung

Chronische Entzündungen stellen einen zunehmend großen medizinischen Problemkreis mit hohem sozio-ökonomischen Impact dar. Hierzu zählen insbesondere folgende Erkrankungsgruppen:

- 5 - Autoimmunerkrankungen und Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises (Manifestationen an u.a. Haut, Lunge, Niere, Gefäßsystem, Nervensystem, Bindegewebe, Bewegungsapparat, endokrinem System)
- Allergische Soforttypreaktionen und Asthma
- Chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen (COPD)
- 10 - Arteriosklerose
- Psoriasis und Kontaktekzem
- Chronische Abstoßungsreaktionen nach Organ-, Knochenmarkstransplantation

15 Viele dieser Erkrankungen zeigen in den letzten Dekaden eine ansteigende Prävalenz nicht nur in den Industrienationen, sondern zum Teil weltweit. So leiden in Europa, Nordamerika, Japan und Australien mittlerweile über 20% der Bevölkerung an allergischen Erkrankungen und Asthma. Chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen sind zurzeit die fünft-häufigste Todesursache weltweit und werden nach Berechnungen der WHO im Jahre 2020 die dritt-häufigste Todesursache

20 darstellen. Arteriosklerose mit den Folgeerkrankungen Herzinfarkt, Schlaganfall und peripherer arterielle Verschlusskrankheit nehmen in der Morbiditäts- und Mortalitätsstatistik weltweit eine führende Position ein. Psoriasis und Kontaktekzem sind zusammen mit der Neurodermitis die häufigsten chronischen Entzündungserkrankungen an der Haut überhaupt.

25 Aufgrund von bis heute nur unzureichend verstandenen Wechselwirkungen zwischen Umweltfaktoren und einer genetischen Disposition kommt es zu nachhaltigen Fehlregulationen des Immunsystems. Hierbei lassen sich für diese unterschiedlichen Erkrankungen folgende gemeinsame Prinzipien feststellen:

- 30 (A) Es kommt zur Entwicklung einer überschießenden Immunantwort gegen normalerweise für den Menschen harmlose Antigene. Diese Antigene können Bestandteile der Umwelt sein (z. B. Allergene, wie Pollen, Tierhaare, Nahrungsmittel, Milben, chemische Substanzen wie Konservierungsstoffe, Farbstoffe, Reinigungsmittel). In diesen Fällen entwickelt sich bei den Pati-

An.139/Renz/Sel

enten eine allergische Reaktion. Im Falle von z.B. Aktiv- und Passiv- Zigarettenrauchern kommt es zu chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD). Andererseits kann das Immunsystem aber auch gegen Komponenten des eigenen Organismus reagieren, diese als fremd erkennen und eine Entzündungsreaktion dagegen in Gang setzen. In diesen Fällen entwickelt sich eine Autoimmunerkrankung. In jedem Falle werden harmlose, nicht-toxische Antigene fälschlicherweise als fremd bzw. gefährlich erkannt und eine unangemessene Entzündungsreaktion in Gang gesetzt.

(B) Die Erkrankungen verlaufen in Phasen zu denen die Initiation, Progression, also Fortschreiten der Entzündungsreaktion, und die damit assoziierte Destruktion und der Umbau mit Verlust von Organ-Funktionalität (sogenanntes Remodeling) zählen.

(C) Die Erkrankungen zeigen Patienten-spezifische sub-phänotypische Ausprägungsmerkmale.

(D) An der Initiation, Aufrechterhaltung und den Destruktions- und Umbauprozessen sind Komponenten der angeborenen und erworbenen Immunität nachhaltig beteiligt. Unter dem Einfluss der angeborenen Immunität (wichtige Komponenten: Antigen-präsentierende-Zellen mit ihren diversen Populationen und das Komplementsystem) kommt es zu Aktivierung und Differenzierung der Zellen des adaptiven Immunsystems (wichtige Komponenten: T- und B-Lymphozyten). Die T-Zellen übernehmen zentrale Funktionen im weiteren Verlauf indem sie in hoch-spezialisierte Effektoren differenzieren. Hierbei aktivieren und erwerben sie bestimmte Effektormechanismen, zu denen insbesondere folgende Funktionen zählen: Antikörperproduktion, Kontrolle der Funktionalität von Effektorzellen des Immunsystems (wie z. B. neutrophile-, basophile-, eosinophile Granulozyten), Rückkopplung auf Funktionen des angeborenen Immunsystems, Beeinflussung der Funktionalität von nicht-hämatopoetischen Zellen wie z. B. Epithel, Endothel, Bindegewebe, Knochen und Knorpel und vor allem neuronale Zellen. Hier kommt es zu einer besonderen Wechselwirkung zwischen Immun- und Nervensystem, aus dem sich das Konzept der Neuro-immunologischen Interaktion bei chronischen Entzündungen entwickelt hat.

An.139/Renz/Sel

Aufgrund der Komplexität und Vielschichtigkeit der Krankheitsbilder, die mit chronischen Entzündungen einhergehen, müssen an ein optimales Arzneimittel zur Behandlung der Krankheiten folgende Anforderungen gestellt werden:

- 5 (1) Erkrankungen manifestieren sich in Patienten-spezifischen (Sub)-Phänotypen. Arzneimittel müssen daher eine hohe Patienten- bzw. Fallspezifität aufweisen.
 - (2) Erkrankungen verlaufen in Stadien und Phasen. Arzneimittel müssen daher eine Stadien- bzw. Phasenspezifität besitzen.
 - 10 (3) Die Erkrankungen werden von unterschiedlich spezialisierten Zellen reguliert. Die Arzneimittel müssen daher eine Zell-spezifische Intervention bewirken.
 - (4) Die Erkrankungen manifestieren sich an unterschiedlichen Organen und Kompartimenten. Die Arzneimittel müssen daher eine Kompartiment- bzw. Organ-Spezifität besitzen.
 - 15 (5) Arzneimittel müssen für eine Langzeittherapie geeignet sein. So müssen Reaktionen des Immunsystems gegen die Arzneimittel verhindert werden.
 - (6) Das Nebenwirkungsprofil der Arzneimittel muss in medizinischer und ethischer Relation zu Schweregrad, Prognose und Verlauf der Erkrankungen in einem akzeptablen Verhältnis stehen.
- 20 Keine der heute verfügbaren, etablierten Therapien gegen chronische Entzündungen erfüllt diese Kriterien optimal. Bekannt sind aus der DE 695 11 245 T2 die Behandlung mit Immunglobulin A und aus der DE 695 18 667 T2 die Hemmung der Phospholipase A₂ (PLA₂) und /oder Coenzym-A-unabhängigen Transacylase (CoA-IT). Im Mittelpunkt der heute etablierten Therapiekonzepte stehen für diese
- 25 Erkrankung die unspezifische anti-inflammatorische Therapie, sowie die Immunsuppression. So sind viele der eingesetzten unspezifischen anti-inflammatorisch wirkenden Substanzen wie Ibuprofen, Acetylsalicylsäure und Paracetamol entweder nicht wirksam genug oder mit einer hohen Rate unerwünschter Nebenwirkungen behaftet. Steroide haben dagegen zwar eine
- 30 höhere Wirkungspotenz, sind aber ihrerseits mit schwerwiegenden Nebenwirkungen wie Hypertonus, Diabetes und Osteoporose behaftet. Immunsuppressive Medikamente der neueren Generation wie z. B. Cyclosporin und Tacrolimus zeigen Hepato- und Nephrotoxizität.

An.139/Renz/Sel

Diese Situation hat zur Suche und klinischen Erprobung einer Vielzahl von neueren Molekülen geführt, die spezifischer in die immunologischen und zellbiologischen Fehlregulationen eingreifen sollen. Hierzu zählen Zytokine, Zytokin-Rezeptoren und Anti-Zytokine. Probleme, die mit diesen neueren therapeutischen

5 Einsätzen verbunden sind, schließen mangelnde Zell- und Organ-Spezifität, Entwicklung von unerwünschten Immunreaktionen gegen diese Moleküle, sowie eine mangelnde Wirksamkeit bei verschiedenen Phänotypen ein.

Es wird in neuerer Zeit versucht, eine neue Klasse katalytischer Moleküle, die sogenannten "DNAzyme" (Santoro, 1997) als therapeutische Agenzien zur Inaktivierung von Genen einzusetzen, deren Expression Krankheiten verursacht. DNAzyme sind Einzelstrang-Moleküle, die prinzipiell an komplementäre Bereiche der RNA binden können und diese durch Spaltung inaktivieren. Der spezifische Einsatz von DNAzymen als therapeutische Agenzien setzt allerdings voraus, dass die

10 krankheitsverursachenden Gene und deren mRNA genauestens bekannt sind. Dies ist bislang nur bei wenigen Erkrankungen der Fall.

Das in der WO 01/11023A1 beschriebene DNAzym bindet RelA (p65) mRNA und ist damit gegen den Transkriptionsfaktor NF- κ B gerichtet. In der WO 00/42173 ist ein EGR-1 mRNA bindendes DNAzym offenbart. Die WO99/50452 offenbart ein

20 10-23 DNAzym, das in einem diagnostischen Verfahren zum Auffinden von Nukleinsäure-Mutationen verwendet werden kann.

Keine der derzeit bekannten Antisense-Moleküle und DNAzyme können zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von chronischen Entzündungen in

25 Patienten verwendet werden.

Aufgabe der Erfindung

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Zell- und/oder Gewebe- und/oder

30 Krankheitsphasen-spezifische Arzneimittel bereitzustellen, die zur funktionellen Inaktivierung von Ribonukleinsäure-Molekülen von Transkriptionsfaktoren und Faktoren der Signaltransduktionswege, deren Expression an der Entstehung von chronischen Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen beteiligt ist,

An.139/Renz/Sel

führen und die zur Behandlung von chronischen Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen geeignet sind, wobei die geschilderten Nachteile im Stand der Technik beseitigt werden.

Darüber hinaus ist es Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung Zell- und/oder Gewebe- und/oder Krankheitsphasen-spezifischer Arzneimittel bereitzustellen, das Ribonukleinsäure-Moleküle von Transkriptionsfaktoren und von Faktoren der Signaltransduktionswege, deren Expression an der Entstehung von chronischen Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen beteiligt ist, identifiziert und sie in Zielzellen funktionell inaktiviert.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren gemäß Anspruch 1 und einem Arzneimittel gemäß den Ansprüchen 16 bis 18 unter Einsatz spezifischer DNAzyme gemäß den Ansprüchen 10 bis 15 gelöst.

Der Vorteil der Erfindung besteht in einer funktionellen Inaktivierung von Ribonukleinsäure-Molekülen von Transkriptionsfaktoren und Faktoren der Signaltransduktionswege zur Differenzierung und/oder Expression von Zytokinen, die an der Entstehung der chronischen Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen beteiligt sind, mittels spezifischer DNAzyme und/oder siRNA. Diese Strategie zeichnet sich gegenüber konventionellen, aber auch gentherapeutischen Ansätzen durch höchste Zell- und/oder Gewebe- und/oder Krankheitsphasen-Spezifität und -Selektivität, hohe Stabilität der Moleküle und eine vernachlässigbare Antigenität aus. Es werden optimale Voraussetzungen für eine maßgeschneiderte Langzeittherapie bei Patienten mit chronischen Entzündungserkrankungen geschaffen.

Weitere Details und Vorzüge der vorliegenden Erfindung werden aus der folgenden Figur und der Beschreibung ersichtlich. Dabei zeigt:

Fig. 1: schematische Darstellung der Signaltransduktion bei der Differenzierung von CD4⁺ Zellen zu TH1- bzw. TH2-Zell (modifiziert nach Ho I.C. und Glimcher L.H., Cell 2002; 109: S109-S120).

Fig. 2: Nukleotidsequenz der katalytischen Domäne des 10-23 DNAzym und Bindung an eine Ziel RNA mittels Watson-Crick Paarung. (R = A oder G;

An.139/Renz/Sel

Y = U oder C, N = A, G, U oder G). Der Pfeil zeigt die Spaltstelle in der Ziel mRNA.

Fig. 3: Pool an spezifischen Ribonukleinsäure Molekülen nach Schritt b) im besonderen die DNAzyme hgd 1 bis hgd 70 gegen GATA-3 und ihre Nucleotidsequenzen (A=Adenin, G=Guanin, C=Cytosin, T=Thymin). Großgeschriebene Nukleotide markieren eine rechte und linke Substratbindungsdomäne, kleingeschriebene Nukleotide markieren die zentrale katalytische Domäne des 10-23 DNAzym.

Fig. 4: Nukleotidsequenzen humaner GATA-3-Gene im Alignment

Sequenz 1: Humanes GATA-3 aus Datenbank Nr.: XM_043124.

Sequenz 2: Humanes GATA-3 aus Datenbank Nr.: X58072.

Sequenz 3: Humanes GATA-3 (sequenziert aus Plasmid pCR2.1).

Divergente Basen sind grau unterlegt, Primerlokalisationen für die Klonierung von GATA-3 sind unterstrichen. Die Lokalisation des DNAzymes hgd40 ist mit fett geschriebenen Buchstaben, die gleichzeitig grau unterlegt und unterstrichen sind, verdeutlicht.

(A=Adenin, G=Guanin, C=Cytosin, T=Thymin)

Fig. 4 A: Nukleotidsequenz 3 des humanen GATA-3-Gen aus Figur 4, darin eingezeichnet (grau hinterlegt) jeweils die Nukleotidpaare GT und AT, zwischen denen weitere DNAzyme-Schnittstellen liegen.

Fig. 5: Gelelektrophorese zeigt die Spaltung einer Ziel-mRNA (hier GATA-3 mRNA) mit spezifischen Ribonukleinsäure Molekülen nach Schritt b), hier nicht modifizierte DNAzyme [hgd11 (Spur 2), hgd13 (Spur 4), hgd17 (Spur 6), hgd40 (Spur 8)] und modifizierten DNAzymen [hgd11-M (Spur 3), hgd13-M (Spur 5), hgd17-M (Spur 7), hgd40-M (Spur 9)]. M bezeichnet die modifizierten DNAzyme. Nicht modifizierte (0,25 μ M) oder modifizierte DNAzyme (0,25 μ M) werden eine Stunde bei 37°C mit in vitro transkribierter GATA-3 mRNA (0,025 μ M) in einem Volumen von 10 μ l mit folgender Reaktionszusammensetzung inkubiert: 50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂. Anschließend werden die Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt. Spur 1 enthält als Kontrolle mRNA ohne DNAzyme-Zugabe. Mitgeführter Längenstandard (nicht dargestellt) zeigt Bandengrößen von 1000 bp, 2000 bp und 3000 bp. Pfeile zeigen auf S,

An.139/Renz/Sel

die Bande mit dem Substrat (hier GATA-3-mRNA) und die Spaltprodukte P1 und P2.

Fig. 6: Immunblot mit der Reaktion von spezifischen Ribonukleinsäure Molekülen in Zellen. Jurkat E6.1 Zellen werden mittels Lipofektion mit spezifischen Ribonukleinsäure Molekülen, hier DNAzyme [hgd11-M (Spur 4), hgd13-M (Spur 5), hgd17-M (Spur 6), hgd40-M (Spur 7)] transfiziert. Als Kontrollen werden nicht behandelte Zellen (Spur 1), nur mit Transfektionsmedium (Spur 2) behandelte Zellen, beziehungsweise mit DNAzymen (hgd11-M) ohne Transfektionsmedium (Spur 3) behandelte Zellen eingesetzt. Nach 48h Inkubation werden die solubilisierten Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und GATA-3 (A) durch Immunblot mit spezifischen Antikörpern detektiert. (Spur 4 enthält Zellen mit hgd11-M, Spur 5 enthält Zellen mit hgd13-M, Spur 6 enthält Zellen mit hgd17-M, Spur 7 enthält Zellen mit hgd40-M.) Zur Kontrolle auf gleiche Proteinmengen pro Spur wird auf der gleichen Blot-Membran eine Immunfärbung mit β -Aktin (B) durchgeführt. Mitgeführter Längenstandart (nicht dargestellt) zeigt Bandengrößen von 63,8 kDa, 49,5 kDa und 37,4 kDa.

Fig. 7: Pool an spezifischen Ribonukleinsäure Molekülen nach Schritt b) Im besonderen die DNAzyme td 1 bis td 70 gegen T-bet und ihre Nukleotidsequenzen (A=Adenin, G=Guanin, C=Cytosin, T=Thymin)

Fig. 8: Nukleotidsequenzen humaner T-bet-Gene im Alignment
Sequenz 1: Humanes T-bet aus Datenbank Nr.: NM_013351.
Sequenz 2: Humanes T-bet (sequenziert aus pBluescript-SK).
Divergente Basen sind grau unterlegt, Primerlokalisierungen für die Klonierung von T-bet sind unterstrichen. Die Primerlokalisierungen für die relative Quantifizierung im LightCycler sind umrandet. Die Lokalisation der DNAzyme td54 und td69 ist gleichzeitig grau unterlegt und unterstrichen, td70 ist zudem in fettgeschriebenen Buchstaben hervorgehoben.
(A=Adenin, G=Guanin, C=Cytosin, T=Thymin)

Fig. 8 A: Nukleotidsequenz 1 des humanen T-bet-Gen aus Figur 8, darin als graue Hinterlegung eingezeichnet jeweils die Nukleotidpaare GT und AT, zwischen denen weitere DNAzyme-Schnittstellen liegen.

An:139/Renz/Sel

9/38

14

Fig. 9: Gelelektrophorese zeigt die Spaltung einer Ziel-mRNA (hier T-bet mRNA) mit spezifischen Ribonukleinsäure Molekülen nach Schritt b), hier modifizierte DNAzyme [(td54m (Spur 3), td69m (Spur 4) und td70m (Spur 5)]. Die modifizierten DNAzyme (0,25 μ M) werden 30 min bei 37°C mit in vitro transkribierter T-bet mRNA (0,025 μ M) in einem Volumen von 10 μ l mit folgender Reaktionszusammensetzung inkubiert: 50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂. Anschließend werden die Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt. Spur M enthält mitgeführten Längenstandard 3000 Basen und 2000 Basen, Spur 2 enthält als Kontrolle mRNA ohne DNAzym-Zugabe. Pfeil A zeigt auf die Bande mit Substrat (hier T-bet-mRNA), Pfeil B auf das größere Spaltprodukt. Das zweite Spaltprodukt ist kleiner und in dieser Abbildung nicht mehr

Fig. 10: Quantifizierung von T-bet- und GAPDH-mRNA Mengen im LightCycler aus, mit DNAzymen td54 (A), td69 (B) und td70 (C) behandelten Zellen. Jurkat E6.1 Zellen werden zweimal in 24h Abstand entweder mit den T-bet-spezifischen DNAzymen td54 (A), td69 (B) und td70 (C) oder mit Nonsense-DNAzym als Kontrolle (nicht dargestellt) transfiziert. Anschließend wird RNA gereinigt, eine reverse Transkription durchgeführt und die gewonnene DNA im LightCycler eingesetzt. Als interner Standard dient GAPDH (gestrichelte Kurven). Gezeigt sind jeweils 4-fach Bestimmungen von mit T-bet-spezifischen DNAzymen oder Nonsense-DNAzym behandelten Zellen. Durchgezogene Kurven zeigen die Menge an T-bet in den mit T-bet-spezifischen DNAzymen behandelten Zellen, gepunktete Linien zeigen die Menge an T-bet in den mit Nonsense-DNAzyme behandelten Zellen.

Fig. 11: Diagramm der relativen Quantifizierung von T-bet-mRNA in Jurkat E6.1 Zellen.

Jurkat E6.1 Zellen werden mit den T-bet-spezifischen DNAzymen td54, td69 und td70 zwei mal transfiziert und nach 48h wird RNA isoliert. Nach einer reversen Transkription wird die mRNA-Menge mittels LightCycler bestimmt. Als Kontrolle dient Nonsense-DNAzym. Die relative Quantifizierung von T-bet- und GAPDH-mRNA erfolgt nach Anleitung [beschrieben im User Bulletin #2 (ABI Prism 7700 Sequence detection System

An.139/Renz/Sel

10/38

15

User Bulletin #2 (2001). Relative quantification of gene expression.

[Http://docs.appliedbiosystems.com/pebiodocs/04303859.pdf](http://docs.appliedbiosystems.com/pebiodocs/04303859.pdf)].

Dabei werden die Menge an T-bet-mRNA aus dem Kontrollversuch mit Nonsense-DNAzym gleich 100% gesetzt.

5

Figur 1 zeigt in einer nach Ho I.C. und Glimcher L.H. (Cell 2002; 109: S109- S120) modifizierten schematischen Darstellung die Zusammenhänge der Signaltransduktion bei der Differenzierung von CD4⁺ Zellen zu TH1- bzw. TH2-Zell.

Die Stimulation über den T-Zellrezeptor durch den entsprechenden Peptid-MHC-Komplex induziert die klonale Expansion und programmierte Differenzierung von CD4⁺ T-Lymphozyten zu T-Helfer (TH)1- oder TH2-Zellen. Die Unterscheidung dieser beiden Subtypen erfolgt aufgrund ihrer Zytokin-Profile. TH1-Zellen produzieren Interferon- γ (INF γ), Interleukin 2 (IL-2) und Tumor-Nekrose-Faktor- β , wohingegen TH2-Zellen IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 sezernieren. Bakterielle und virale Infektionen induzieren eine Immunantwort, die von TH1-Zellen dominiert wird. Auf der anderen Seite regulieren TH2-Zellen die IgE Produktion gegen Parasiten. Dabei besteht zwischen TH1- und TH2-Zellen ein Gleichgewicht. Die Zerstörung dieses Gleichgewichtes verursacht Krankheiten, so ist eine überschießende TH1-Zellenantwort assoziiert mit Autoimmunerkrankungen, während allergischen Erkrankungen eine verstärkte TH2-Zellantwort zugrunde liegt.

Es ist bekannt, dass TH1-Zytokine in die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie z.B. Autoimmunuveitis, experimentelle allergische Enzephalomyelitis, Typ 1 Diabetes mellitus oder Morbus Crohn involviert sind, während TH2-Zytokine (IL-4, IL-5, IL-13 bzw. IL-9) an der Entstehung von chronisch entzündlichen Atemwegserkrankungen wie z.B. Atemwegseosinophilie, Mukus-Hypersekretion und Atemwegs-Hyperreagibilität beteiligt sind. Grundlage dieser Erkrankungen sind pathophysiologische Veränderungen während der Produktion von charakteristischen Zytokinen durch antigenspezifische TH-Zellen. So zeigen transgene Mäuse, die in den Atemwegsepithellen die TH2-Zytokine IL-4, IL-5, IL-13 bzw. IL-9 konstitutiv überexprimieren, typische allergische Entzündungsreaktionen. TH2-Zell-Subpopulationen in der Lunge und den Atemwegen rufen in TH2-Zellen im Tiermodell die charakteristischen Symptome des Asthma bronchiale hervor.

An.139/Renz/Sel

11/38

16

Überraschenderweise wurde gefunden, dass zur Zell- und/oder Gewebe-spezifischen Behandlung von chronischen Entzündungen und/oder Autoimmunerkrankungen Transkriptionsfaktoren und Faktoren der Signaltransduktionswege zur Differenzierung und/oder Expression von Zytokinen, die an der Entstehung der

5 chronischen Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen beteiligt sind wie z.B.: der TH1-Zell-spezifische Transkriptionsfaktor T-bet und der TH2-Zell-spezifische Transkriptionsfaktor GATA-3 in idealer Weise geeignet sind.

Der TH1-Zell-spezifische Transkriptionsfaktor T-bet ist vor allem für die Differen-

10 zierung von naiven $CD4^+$ T-Zellen zu TH1-Zellen verantwortlich. Seine Expression wird über die Signaltransduktionswege des T-Zell Rezeptors (TZR) und über INF γ -Rezeptor/STAT1 kontrolliert. T-bet transaktiviert das endogene INF γ -Gen und induziert die INF γ Produktion. Darüber hinaus induziert er die Hochregulation der Protein-Expression von IL-12R β 2 Ketten und führt zum Chromatin-Remodeling

15 von individuellen INF γ Allelen. Die in vivo Funktion von T-bet wird in Knock-Out-Mäusen (T-bet $^{-/-}$) bestätigt. Obwohl T-bet defiziente Mäuse eine normale Lymphozyten Entwicklung aufweisen, produzieren $CD4^+$ T-Zellen aus diesen Mäusen kein INF γ , weder auf die Stimulation mit anti-CD3/CD28 noch mit PMA/Ionomycin. T-bet defiziente Mäuse zeigen keine Immunantwort auf eine *L. major* Infektion, die

20 Menge an TH2-Zytokinen ist erhöht.

Bekannt ist die Funktion von T-bet in mucosalen T-Zellen bei der Entstehung von entzündlichen Darmerkrankungen. Untersuchungen im Tiermodell zeigen eine Verschlimmerung der Colitis in rekonstituierten SCID (Severe Combined Immuno-

deficiency) Mäusen nach retroviraler Transduktion von T-bet in $CD4^+CD26L^+$ T-

25 Zellen, umgekehrt führt der Transfer von T-bet defizienten T-Zellen zu keiner Colitis -Induktion.

Der Transkriptionsfaktor T-bet induziert spezifisch die Entwicklung von TH1-Zellen und kontrolliert die INF γ -Produktion in diesen Zellen. Durch die Inhibition von T-bet wird die Balance zwischen TH1- und TH2-Zellen zugunsten von TH2-Zellen

30 verschoben.

Der TH2-Zell-spezifische Transkriptionsfaktor GATA-3 ist vor allem für die Differenzierung von naiven $CD4^+$ T-Zellen zu TH2-Zellen verantwortlich.

An.139/Renz/Sel

Die TH2-Zelldifferenzierung wird dabei hauptsächlich durch zwei Signalübertragungswege, den T-Zell Rezeptor- (TZR) und den IL-4 Rezeptor-Weg, gesteuert. Vom TZR weitergeleitete Signale aktivieren sowohl die TH2 zellspezifischen Transkriptionsfaktoren c-Maf und GATA-3 als auch die Transkriptionsfaktoren NFAT und AP-1. Die Aktivierung des IL-4 Rezeptors führt zur Bindung von STAT6 an die zytoplasmatische Domäne des IL-4 Rezeptors, wo er von Jak1- und Jak3-Kinasen phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung ihrerseits führt zur Dimerisierung und Translokation von STAT6 in den Nukleus, wo STAT6 die Transkription von GATA-3 und anderen Genen aktiviert.

- 10 GATA-3 ist ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der nach „Representational-Difference-Analysis“ (RDA) und Studien an transkriptioneller Regulation von IL-5 ausschließlich in murenen TH2-Zellen exprimiert wird, nicht in TH1-Zellen.

Weitere Transkriptionsfaktoren, die eine Rolle bei der Differenzierung zu TH1- beziehungsweise TH2-Zellen spielen und an der Entstehung der chronischen Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen beteiligt sind weisen eine Expression auf, die sich in einer Zielzelle im Vergleich zur Expression einer Kontrollzelle unterscheidet und werden erfindungsgemäß ebenfalls zum Design von spezifischen DNAsyzen und/oder siRNA für den therapeutischen Einsatz bei chronisch entzündlichen Erkrankungen eingesetzt:

- 20 • STAT4, STAT5a und STAT1 (signal transducer and activator of transcription)
- c-Rel
- CREB2 (cAMP response element-binding protein 2)
- ATF-2, ATF-2
- 25 • Hlx
- IRF-1 (Interferon regulatory factor-1)
- c-Maf
- NFAT (Nuclear factor of activated T cells)
- NIP45 (NF-AT interacting protein 45)
- 30 • AP1 (Activator Protein 1)
- Mel-18
- SKAT-2 (SCAN box, KRAB domain associated with a Th2 phenotype)

An.139/Renz/Sel

- CTLA-4 (Cytolytic T lymphocyte-associated antigen 4)

Weitere Faktoren der Signaltransduktionswege, die zur Differenzierung und/oder Expression von Zytokinen verantwortlich sind und an der Entstehung der chronischen Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen beteiligt sind, weisen eine Expression auf, die sich in einer Zielzelle im Vergleich zur Expression einer Kontrollzelle unterscheidet und werden erfindungsgemäß ebenfalls zum Design von spezifischen DNAzymen und/oder siRNA für den therapeutischen Einsatz bei chronisch entzündlichen Erkrankungen eingesetzt:

- 10 • Src kinase
- Tec kinase
 - Rlk (Txk im Menschen)
 - Itk
 - Tec
- 15 • RIBP (Rlk/Itk-binding protein)
- PLCγ (Phospholipase Cy1)
- MAP kinase (Mitogen-activated protein kinase)
 - ERK
 - 20 JNK
 - P38
- MKK (MAP kinase kinase)
 - MKK1
 - MKK2
 - 25 MKK3
 - MKK4
 - MKK6
 - MKK7
- Rac2
- 30 • GADD45 (Growth arrest and DNA damage gene 45)
 - GADD45β
 - GADD45γ

An.139/Renz/Sel

- SOCS (Suppressors of cytokine signalling)
 - CIS (Cytokine-induced SH2 protein)
 - SOCS1
 - SOCS2
 - SOCS3
- JAK (Janus kinase)
 - JAK1
 - JAK3
- NIP45 (NF-AT Interacting protein)

Erfindungsgemäß wird ein Zell- und/oder Gewebe- und/oder Krankheitsphasen-spezifisches Arzneimittel bereitgestellt, das zur Behandlung von chronischen Entzündungen geeignet ist.

Das Arzneimittel greift bevorzugt an den Interventionspunkten der den chronischen Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen zugrunde liegenden komplexen Kaskade der immunologischen und zellbiologischen Fehlregulationen an. Besonders bevorzugt sind dies Interventionspunkte der Regulation der Differenzierung der beteiligten Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise der TH2-Zell-spezifische Transkriptionsfaktor GATA-3 oder der TH1-Zell-spezifische Transkriptionsfaktor T-bet. Der erzielte therapeutische Effekt besteht in einer funktionellen Inaktivierung von mRNA-Molekülen mittels spezifischer DNAsyme und/oder siRNA. Diese Strategie bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber konventionellen, aber auch gentherapeutischen Ansätzen: höchste Spezifität und Selektivität, hohe Stabilität der Moleküle und eine vernachlässigbare Antigenität. Es werden optimale Voraussetzungen geschaffen für eine maßgeschneiderte Langzeittherapie bei Patienten mit chronischen Entzündungserkrankungen.

An.139/Renz/Sel

Erfindungsgemäß wird ein Verfahren zur Herstellung eines Zell- und/oder Gewebe- und/oder Krankheitsphasen-spezifischen Arzneimittels bereitgestellt, dass folgende Schritte umfasst:

- a) Identifikation von Ribonukleinsäure-Molekülen, deren Expression sich in einer Zielzelle im Vergleich zur Expression einer Kontrollzelle unterscheidet
- b) Design von spezifischen Ribonukleinsäure-Molekülen, die an Ribonukleinsäure-Moleküle aus Schritt a) binden und sie funktionell inaktivieren
- c) Einbringen der spezifischen Ribonukleinsäure-Moleküle aus Schritt b) in Zielzellen
- 10 d) Formulierung der spezifischen Ribonukleinsäure-Molekülen aus Schritt b) und/oder einer Zielzelle aus Schritt c) in einem Arzneimittel

- Der Begriff „Zell- und/oder Gewebe- und/oder Krankheitsphasen-spezifisch“ bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung, dass das mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens hergestellte Arzneimittel im wesentlichen nur bei einer bestimmten Art von Zellen (Zielzelle) und/oder in bestimmten Geweben oder Organen und/oder in bestimmten Phasen der Erkrankung wirksam ist, und einen vernachlässigbaren Einfluss auf andere Zellen (Kontrollzellen), Gewebe oder Organe besitzt. Vorzugsweise ist das Arzneimittel bei mindestens 2/3 der Zielzellen wirksam. Stärker bevorzugt bei mindestens 80% und am meisten bevorzugt bei mindestens 98% der Zielzellen. Es ist außerdem bevorzugt, dass das Arzneimittel bei höchstens 10% der Kontrollzellen wirksam ist, stärker bevorzugt bei höchstens 5% und am meisten bevorzugt bei < 1% der Kontrollzellen.

- 25 Der Begriff „Identifikation von Ribonukleinsäure-Molekülen, deren Expression sich in einer Zielzelle im Vergleich zur Expression einer Kontrollzelle unterscheidet“ umfasst in der vorliegenden Erfindung folgende Punkte:
- i) Zielzellen sind Zellen in Geweben und Organen, die bekannterweise zur Entstehung einer Krankheit führen, dazu beitragen oder diese verstärken, die die Krankheit aufrecht erhaltenden Prozesse unterhalten, zu ihnen beitragen oder diese verstärken, beziehungsweise die zu Spätfolgen einer Krankheit führen, beitragen oder sie verstärken. Dazu zählen beispielsweise Zellen, die bestimmte Transkripti-
 - 30

An.139/Renz/Sel

onsfaktoren aufweisen, spezifische Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren sezernieren, oder Zellen mit typischen Oberflächenrezeptoren.

ii) Die Zielzellen können zum Beispiel mittels Technologien isoliert werden, die auf der Bindung spezifischer Antikörper basieren. Hier werden Magnetic Beads, erhältlich von den Firmen Miltenyi (Macs-System), Dynal (DynaBeads) oder BD-Bioscience (iMAG) angewendet. Alternativ erfolgt dies über eine Zellreinigung mittels Fluoreszenz-markierter Antikörper an Zellsortern beispielsweise der Firma Cytomation (MOFLO) oder BD-Bioscience (FACS-Vantage). Die Reinheit der Zielzellen ist bevorzugt bei mindestens 80%, stärker bevorzugt bei mindestens 95% und am meisten bevorzugt bei mindestens 99%.

iii) Verfahren zur Isolierung der RNA sind z.B. in Sambrook and Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory (2001), New York und Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1998), New York, beschrieben. Außerdem ist es dem Durchschnittsfachmann möglich, kommerziell verfügbare Kits (Silika-Technologie) z.B. das RNeasy Kit von der Firma Qiagen, zur RNA Isolierung zu verwenden. Weiterhin ist es bevorzugt, direkt mRNA aus den Zielzellen durch Verwendung kommerzieller Kits beispielsweise der Firmen Qiagen (Oligotex mRNA Kit), Promega (PolyAtract mRNA Isolation System) oder Miltenyi (mRNAdirect) zu reinigen.

iv) Die Identifizierung von mRNAs, die differentiell unterschiedlich sind, d.h. mRNAs, deren Expression in der Zielzelle gegenüber der Kontrollzelle erhöht ist, erfolgt beispielsweise mit kommerziell erworbenen Genchips (z.B. MWG, CLONTECH) oder mit einem Filter-Hybridisierungsverfahren (z. Bsp. Unigene) nach Herstellerangaben. Alternativ werden differentielle mRNAs durch subtraktive Hybridisierung von cDNA, die zuvor aus der mRNA durch RT-Reaktion entstanden sind, hergestellt. Zu diesen dem Fachmann bekannten Verfahren, zählen beispielsweise die SSH-Methode (Firma Clontech) oder die RDA-Methode. Zu einer ebenfalls bevorzugten Anwendungsform gehört die Kombination von Chiptechnologie und subtraktiver Hybridisierung. Die Identifizierung der differentiell exprimierten Gene erfolgt unter Einsatz der Chiptechnologie mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Programmen z.B. mit dem Vector Xpression Programm der Firma InforMax. Beim Einsatz von subtraktiver Hybridisierung erfolgt nach der Isolierung der differentiell exprimierten Gene anhand herkömmlicher, dem Fachmann geläufiger

An.139/Renz/Sel

- figer Verfahren wie Klonierung und anschließende Sequenzierung (siehe z.B. Sambrook and Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory (2001), New York und Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1998), New York) ein Sequenzabgleich
 5 In einer Datenbank wie z.B. Gene-Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Die Expression in der Zielzelle unterscheidet sich im Vergleich zur Expression in einer Kontrollzelle. In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Expression in der Zielzelle im Vergleich zur Expression in einer Kontrollzelle erhöht, vorzugsweise mindestens um einen Faktor 1,5. In einer besonders bevor-
 10 zugten Ausführungsform ist die Expression in der Zielzelle im Vergleich zur Expression in einer Kontrollzelle um mindestens einen Faktor 5 erhöht, und in einer am meisten bevorzugten Ausführungsform ist die Expression nur in der Zielzelle, jedoch nicht in der Kontrollzelle nachweisbar.

- 15 Der Begriff „Design von Ribonukleinsäure Molekülen, die an Ribonukleinsäure Moleküle aus Schritt a) binden und sie funktionell inaktivieren“ umfasst im Sinne der vorliegenden Erfindung die Verwendung von RNA-inaktivierenden-DNA-Enzymen (DNAzymen) und/oder Small-Interfering-RNA (siRNA), die Ribonukleinsäure Moleküle funktionell inaktivieren.
- 20 Der Begriff DNAzyme umfasst dabei erfindungsgemäß DNA-Moleküle, die die Ziel-Sequenz der Nukleinsäure, sowohl DNA als auch RNA, spezifisch erkennen und spalten.
- Ein generelles DNAzyme-Modell stellt das „10-23“-Modell dar. DNAzyme des 10-23-Modells - auch als „10-23 DNAzyme“ bezeichnet - besitzen eine katalytische
 25 Domäne von 15 Desoxyribonukleinsäuren, welche von zwei Substratbindungsdomänen flankiert wird. Die Länge der Substratbindungsdomänen ist variabel, sie sind entweder gleich oder unterschiedlich lang. In einer bevorzugten Ausführung, beträgt die Länge der Substratbindungsdomänen zwischen 6 und 14 Nukleotide.
- In einer besonders bevorzugten Ausführung sind die Substratbindungsdomänen
 30 vollständig komplementär zu der Region, die die Spaltstelle flankiert. Um die Ziel RNA zu binden und sie zu spalten, muss das DNAzyme jedoch nicht unbedingt vollständig komplementär sein. In vitro Untersuchungen zeigen, dass DNAzyme des 10-23 Typs die Ziel mRNA an Purin-Pyrimidin Abfolge-Sequenzen spalten.

An.139/Renz/Sel

Um die DNAzyme in der Behandlung von Krankheiten zu verwenden, ist es bevorzugt, dass die DNAzyme so gut wie möglich gegen Degradation im Körper (im Blut, im intrazellulären Milieu usw.) stabilisiert sind. Eine bevorzugte Ausführung ist die Einführung einer 3'-3'-Inversion an einem oder mehreren Enden des DNAzymes. Der Begriff 3'-3'-Inversion bezeichnet eine kovalente Phosphatbindung zwischen den 3'-Kohlenstoffen des terminalen Nukleotids und des angrenzenden Nukleotids. Dieser Typ von Bindung steht im Gegensatz zu der normalen Phosphatbindung zwischen den 3' und 5' Kohlenstoffen von aufeinander folgenden Nukleotiden. Dementsprechend wird bevorzugt, dass das Nukleotid am 3'-Ende der an das 3'-Ende der katalytischen Domäne angrenzenden Substratbindungsdomäne invers ist. Zusätzlich zu den Inversionen können die DNAzyme modifizierte Nukleotide oder Nukleotid-Verbindungen enthalten. Modifizierte Nukleotide beinhalten z.B. N3'-P5'-Phosphoramidat Verbindungen, 2'-O-Methyl-Substitutionen und Peptid-Nukleinsäure-Verbindungen. Ihre Herstellung ist dem Fachmann geläufig.

Obwohl die potentiellen DNAzyme-Schnittstellen ubiquitär vorkommen, sind diese oft durch die sekundäre Struktur der RNA blockiert und somit den DNAzymen unzugänglich. Daher werden aus einem Pool an DNAzymen diejenigen selektioniert, deren Schnittstellen frei zugänglich sind. Diese selektionierten DNAzyme sind aktiv, spalten die Ziel-mRNA und inaktivieren sie somit funktionell. Die Effizienz der Spaltung der mRNA durch die einzelnen DNAzyme wird entweder durch Einzeltestung jedes DNAzymes oder durch gekoppelte Testung mehrerer DNAzyme in „Multiplex-Assays“ (beschrieben z. B. in Cairns et al., 1999) gezeigt.

Der Begriff siRNA umfasst erfindungsgemäß doppelsträngige, 21-23 Basen lange RNA-Moleküle, die zu einer spezifischen Degradation der komplementären Ziel-mRNAs sowohl in vitro als auch in vivo führen. Es ist dem Fachmann anhand der Literatur (z.B. <http://www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/100/105/index.html>) bekannt, ausgehend von der Ziel-mRNA Sequenz siRNA-Moleküle herzustellen. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich unter drei ausgewählten siRNA-Molekülen mindestens ein hochaktives (Inhibition der Ziel-RNA um mindestens 80%) befindet wird in der Literatur mit mindestens 70% angegeben. Es werden aus einem Pool

An.139/Renz/Sel

an siRNA-Molekülen diejenigen selektioniert, die zu einer spezifischen Degeneration der komplementären Ziel-mRNA sowohl in vitro als auch in vivo führen.

Der Begriff „Einbringen der spezifischen Ribonukleinsäure Moleküle aus Schritt b) in Zielzellen“ umfasst im Sinne der vorliegenden Erfindung die Transfektion von Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren oder Bakteriophagen, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen spezifischen Ribonukleinsäuremoleküle enthalten, in die Zielzellen. Vorzugsweise sind die Vektoren zur Transformation tierischer und humaner Zellen geeignet und erlauben die Integration der erfindungsgemäßen Ribonukleinsäuremoleküle. Verfahren zur Transfektion wie z.B. Lipofektion mittels DMRIE-C der Firma Invitrogen sind dem Fachmann aus der Literatur bekannt. Grundsätzlich sind dafür auch liposomale Vektoren geeignet. Die Zielmoleküle sind Transkriptionsfaktoren, Zellen, die Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren sezernieren, aber auch Zellen, die auf der Oberfläche der exprimierten Rezeptoren tragen.

Als Kontrollzellen im Sinne der Erfindung werden gesunde Zellen des Zielgewebes, typgleiche Zellen aus anderen Kompartimenten desselben Patienten oder auch aus gesunden Individuen herangezogen.

Die Kultivierung der Zielzelle erfolgt in Nährmedien, die den Bedürfnissen der Zielzelle nach pH-Wert, Temperatur, Salzkonzentration, Antibiotika, Vitaminen, Spurenelementen und Belüftung entsprechend angepasst sind.

Der Begriff Patient bezieht sich gleichermaßen auf Menschen und Wirbeltiere. Damit kann das Arzneimittel in der Human- und Veterinärmedizin verwendet werden.

Der Begriff „Formulierung der spezifischen Ribonukleinsäure Moleküle aus Schritt b) oder einer Zielzelle aus Schritt c) in einem Arzneimittel“ umfasst pharmazeutisch akzeptable Kompositionen, die Modifikationen und "Prodrugs" beinhalten, sofern sie nach zuverlässiger medizinischer Beurteilung keine übermäßige Toxizität, Irritationen oder allergische Reaktionen am Patienten auslösen. Der Terminus "Prodrug" bezieht sich auf Verbindungen, die zur Verbesserung der Aufnahme transformiert werden, wie beispielsweise durch Hydrolyse im Blut.

An.139/Renz/Sel

Bevorzugter Weise ermöglicht die Formulierung, dass die spezifischen Ribonukleinsäure Moleküle den Patienten in Form einer pharmazeutisch akzeptablen Komposition entweder oral, rektal, parenteral, intravenös, intramuskulär oder subkutan, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, intrathekal, intravasculär, lokal (Puder, Salbe oder Tropfen) oder in Sprayform verabreicht werden.

Dosierungsformen für die örtliche Administration des Arzneimittels dieser Erfindung schließen Salben, Puder, Sprays oder Inhalationsmittel ein. Die aktive Komponente wird unter sterilen Bedingungen mit einem physiologisch akzeptablen Trägerstoff und möglichen Preservativen, Puffern oder Treibmitteln, je nach Bedarf, vermischt.

Die Art der Dosierung wird vom behandelnden Arzt entsprechend den klinischen Faktoren bestimmt. Es ist dem Fachmann bekannt, dass die Art der Dosierung von verschiedenen Faktoren wie z.B. Körpergröße, Gewicht, Körperoberfläche, Alter, Geschlecht oder der allgemeinen Gesundheit des Patienten abhängig ist, aber auch von dem speziell zu verabreichenden Mittel, der Dauer und Art der Verabreichung und von anderen Medikamenten, die möglicherweise parallel verabreicht werden.

Das mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte Arzneimittel weist eine hohe Patienten-, Krankheits-, Stadien- bzw. Phasenspezifität auf. Es bewirkt eine Zell-spezifische Intervention und ist spezifisch für Kompartimente und Organe. Es entstehen keine oder nur sehr geringe Reaktionen des Immunsystems gegen das Arzneimittel, und das Nebenwirkungsprofil steht in einem akzeptablen Verhältnis zu Schweregrad, Prognose und Verlauf der Erkrankung.

Das Arzneimittel kann zur Therapie gegen sämtliche Erkrankungsgruppen, die mit chronischen Entzündungen einhergehen, wie z.B. Autoimmunerkrankungen, Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises (Manifestationen an u. a. Haut, Lunge, Niere, Gefäßsystem, Nervensystem, Bindegewebe, Bewegungsapparat, Endokrines System), Allergische Soforttypreaktionen und Asthma, Chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen (COPD), Arteriosklerose, Psoriasis und Kontakt-ekzem sowie gegen chronische Abstoßungsreaktionen nach Organ- und Knochenmarkstransplantation angewendet werden.

An.139/Renz/Sel

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1: GATA-3

- 5 a) Identifikation von Ribonukleinsäure Molekülen, deren Expression in einer Zielzelle sich im Vergleich zur Expression einer Kontrollzelle unterscheidet

i) Als Zielzellen werden die für die Entstehung von chronischen Entzündungsreaktionen verantwortlichen naiven CD4⁺ Zellen verwendet.

- 10 ii) Die CD4⁺ Zielzellen werden über Magnetic Beads (Firma Miltenyi (Macs-System) Dynal (DynaBeads) oder BD-Bioscience (IMAG) isoliert, alternativ mittels Fluoreszenz-markierter Antikörper an Zellsortern beispielsweise der Firmen Cytomation (MOFLO) oder BD-Bioscience (FACS-Vantage).

- 15 iii) Isolierung der RNA erfolgt nach Standard-Methode, siehe Sambrook and Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory (2001), New York und Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1998), New York.

Alternativ wird ein RNeasy Kit der Firma Qiagen verwendet, oder es erfolgt direkte Isolierung der mRNA aus CD4⁺Zielzellen mit Oligotex mRNA Kit der Firmen Qiagen nach Herstellerangaben.

20

iv) Die Identifizierung von mRNAs, die differentiell unterschiedlich sind, d.h. mRNAs, deren Expression in der Zielzelle gegenüber der Kontrollzelle erhöht ist, erfolgt mittels Genchips (z.B. MWG, CLONTECH), und die Identifizierung der differentiell exprimierten Gene mittels Vector Xpression Programm der Firma Infor-

- 25 Max.

Filter-Hybridisierungsverfahren (z. Bsp. Unigene) nach Herstellerangaben. Der Isolierung der differentiell exprimierten Gene schließt sich Klonierung, Sequenzierung (nach Standardvorschriften siehe z.B. Sambrook and Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory (2001)

- 30 und der Sequenzabgleich in der Gene-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) an.

Die Expression von GATA-3 unterscheidet sich in der Zielzelle (TH2-Zelle) im Vergleich zur Expression in einer Kontrollzelle (beispielsweise Th0-Zelle).

An.139/Renz/Sel

b) Design von spezifischen Ribonukleinsäure Molekülen, die an Ribonukleinsäure Moleküle aus Schritt a) binden und sie funktionell inaktivieren

5 Figur 3 zeigt den erfindungsgemäßen Pool hgd 1 bis hgd 70 an spezifischen DNAzymen gegen GATA-3 mRNA. Die DNAzyme weisen eine Gesamtlänge von 33 Nukleotiden auf, wobei die zentrale katalytische Domäne 15 Nukleotiden (in kleingeschriebenen Buchstaben) der katalytischen Domäne des bekannten 10-23 DNAzyme (Figur 2) entspricht. Diese katalytische Domäne wird von zwei aus je-
10 weils 9 Nukleotiden bestehenden rechten und linken Substratbindungsdomänen (in großgeschrieben Buchstaben) flankiert. Die Nukleotidsequenz der rechten und linken Substratbindungsdomäne ist unterschiedlich und variiert bei den DNAzymen hgd 1 bis hgd 70, so dass eine unterschiedlich spezifische Bindung mittels Watson-Crick Paarung an die GATA-3 mRNA erfolgt.

15 Figur 2 zeigt das allgemeine Modell zur Bindung des 10-23 DNAzyme an eine mit N markierte beliebige Ziel RNA, wobei der Pfeil auf die Spaltstelle in der Ziel mRNA hinweist.

DNAzyme können die Ziel-mRNA zwar an jeder Purin-Pyrimidin Sequenz spalten, aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass Purin-Uracil-Bindungen effektiver gespalten werden als Purin-Cytosin-Bindungen. Deshalb werden vorzugsweise
20 DNAzyme konstruiert, die an Purin-Uracil-Bindungen spalten.

Das in Figur 2 gezeigte Modell kann in seiner Funktionsweise auf die Bindung der DNAzyme hgd 1 bis hgd 70 an GATA-3 mRNA übertragen werden.

25 Die DNAzyme hgd 1 bis hgd 70 werden für in vitro Versuche unmodifiziert eingesetzt, für Versuche in Zellkultur mit Modifikationen versehen (käuflich erworben durch Firma Eurogentec).

Als Modifikationen zur Stabilisierung und Schutz werden eingesetzt:

- 30 1) Ein stabilisierendes Inverses Thymidin am 3'-Ende
2) eine FAM-Markierung am 5'-Ende zur Beurteilung der Transfektionseffizienz der Zellen mittels FACS-Analyse.

An.139/Renz/Sel

Um die DNAszyme in vitro zu testen, wird GATA-3 mRNA benötigt, die durch in vitro Transkription hergestellt wird. Die einzelnen Schritte sind wie folgt:

- RNA-Isolierung aus humanem EDTA-Vollblut mittels QIAamp-RNA-Blood-Mini-Kit (Qiagen, Deutschland) nach Herstellerangaben

5 - reverser Transkription mit den Primern:

Forward-Primer GGCGCCGTCTTGATACTTT

Revers-Primer CCGAAAATTGAGAGAGAAGGAA, wobei ein PCR-Produkt mit einer Länge von 2731 Nukleotiden amplifiziert wird (JumpStart Accu Taq DNA Polymerase, Sigma).

10 PCR Bedingungen: Initiale Denaturierung (96°C, 30 Sek.) Amplifikation mit 40 Zyklen (94°C, 15 Sek.; 48°C, 30 Sek.; 68°C, 3 Min.), Final Extension (68°C, 30 Min).

Das PCR-Produkt wird mittels Standardverfahren in das Plasmid pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und zur Überprüfung sequenziert. Die Herstellung von GATA-3

15 mRNA erfolgt nach Linearisierung des GATA-3 enthaltenden Plasmids pCR2.1 durch Spaltung mit dem Restriktionsenzym *Spe I* durch in vitro Transkription nach Herstellerangaben (Ambion). GATA-3 mRNA liegt mit einer Länge von insgesamt 2876 Nukleotiden vor.

20 Figur 4 zeigt die bekannten Nukleotidsequenzen humaner GATA-3-Gene aus Datenbankeinträgen [PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>)], wobei divergente Basen grau unterlegt sind. Sequenz 1: Humanes GATA-3 aus Datenbank Nr.: XM_043124, Sequenz 2: Humanes GATA-3 aus Datenbank Nr.: X58072, Sequenz 3: Humanes GATA-3 (isoliert aus Plasmid pCR2.1).

25 Die GATA-3 mRNA Sequenzen unterscheiden sich bezüglich der Länge der 3'-untranslatierten oder 5'-untranslatierten Enden voneinander. Um die exakte Gesamt-Sequenz der mRNA zu erhalten, werden zur Primerselektion die mRNA Sequenzen der Einträge Nr.: XM_043124 und X58072 verwendet. Die Primerlokalisations-
30 sationen für die Klonierung von GATA-3 sind in Figur 4 als Unterstreichung hervorgehoben. Figur 4 zeigt weiterhin ein Alignment der Nukleinsäuresequenz von GATA-3 aus der Datenbank (Sequenz 1 und 2) mit der aus Plasmid pCR2.1 sequenzierten Nukleotidsequenz (Sequenz 3). Dabei zeigt sich, dass die Sequenzen

An.139/Renz/Sel

nicht vollkommen identisch, sondern einzelne Basen unterschiedlich sind. Die Nukleinsäuresequenz 3 von GATA-3 aus Figur 4 bildet erfindungsgemäß die Grundlage für die Konstruktion von DNAzymen gegen GATA-3 mRNA.

- 5 Figur 4 A zeigt die Nukleotidsequenz der Sequenz 3 des humanen GATA-3-Gen aus Figur 4 und darin als graue Hinterlegung eingezeichnet jeweils zwei Nukleotide GT bzw. AT, zwischen denen weitere potentielle Schnittstellen für DNAzyme liegen.
- 10 Die in vitro Spaltungsexperimente von GATA-3 mRNA mit den DNAzymen (hgd1-hgd70) werden in einem Volumen von 10 µl folgender Reaktionszusammensetzung durchgeführt: 50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0,25 µM DNAzyme und 0,025 µM in vitro transkribierte GATA-3 mRNA (in einem Substrat zu DNAzyme Verhältnis von 1:10). Die Reaktionen werden bei 37°C für die jeweils
- 15 angegebenen Zeiten inkubiert. Durch die Zugabe von Formamid- und EDTA-haltigem RNA-Sample-Loading-Buffer (Sigma) wird die Reaktion gestoppt. Die denaturierten Proben werden in 1,3 %igen TAE-Agarose-Gelen aufgetrennt und im UV-Transilluminator analysiert.
- Figur 5 zeigt als Ergebnis der Gelelektrophorese die Spaltung der GATA-3 Ziel-
- 20 mRNA mit nicht modifiziertem DNAzyme [hgd11 (Spur 2), hgd13 (Spur 4), hgd17 (Spur 6), hgd40 (Spur 8)] und modifizierten DNAzymen [hgd11-M (Spur 3), hgd13-M (Spur 5), hgd17-M (Spur 7), hgd40-M (Spur 9)]. Spur 1 enthält als Kontrolle mRNA ohne DNAzym-Zugabe. Die modifizierten DNAzyme sind mit einem zusätzlichen M gekennzeichnet. Ein mitgeführter Längenstandard (nicht dargestellt) zeigt
- 25 Bandengrößen von 1000 bp, 2000 bp und 3000 bp. Pfeile zeigen auf S, die Bande mit dem Substrat (hier GATA-3-mRNA) und die Spaltprodukte P1 und P2.

Der Vergleich zwischen allen 70 DNAzymen zeigt, dass hgd11, hgd13, hgd17 und hgd40 besonders aktiv sind, die Modifikationen die Effektivität der DNAzyme

30 hgd11, hgd13 und hgd17 herabsetzt, nicht jedoch die Effektivität des DNAzymes hgd40.

Die folgende Tabelle zeigt die Einteilung der DNAzyme hgd 1 bis hgd 70 gegen GATA-3 mRNA in 4 Gruppen. Diese Gruppeneinteilung erfolgt aufgrund durchge-

An.139/Renz/Sei

fürher in-vitro Aktivitätstestungen der DNAsyme gegen GATA-3 mRNA. Gruppe 1: hohe Spaltungsaktivität, Gruppe 2: mittlere Spaltungsaktivität, Gruppe 3: schwache Spaltungsaktivität und Gruppe 4: keine messbare Spaltungsaktivität.

Gruppe	hgd	Aktivität gegen GATA-3 mRNA
1	11, 13, 17, 40	Hohe Spaltungsaktivität
2	10, 12, 16, 18, 23, 31, 36, 37, 39, 52, 57, 58, 63, 70	Mittlere Spaltungsaktivität
3	22, 24, 25, 34, 35, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 54, 55, 56, 57	Schwache Spaltungsaktivität
4	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 19, 20, 21, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 38, 44, 51, 53, 59, 60, 61, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 69	Keine Spaltungsaktivität

5

c) Einbringen der spezifischen Ribonukleinsäure Moleküle aus Schritt b) in Zielzellen

Die hoch aktiven DNAsyme hgd11, hgd13, hgd17 und hgd40 werden mit und ohne die beschriebenen Modifikationen in Zielzellen verwendet.

10

Dazu werden Jurkat E6.1 Zellen (human acute T cell leukemia Cells) im RPMI-Medium mit 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 10% FKS bei 37°C in befeuchteter 5 %iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Die Transfektionen werden in 6-Wellplatten durchgeführt. Hierfür werden 2x10⁶ Jurkat E6.1 Zellen in Opti-MEM-I-Zellkulturmedium (Invitrogen) überführt und mittels DMRIE-C (Invitrogen) mit den modifizierten DNAsyemen (0,3 µM) transfiziert (nach Herstellerangaben der Firma Invitrogen). Nach 10 Stunden Inkubation im Brutschrank unter obigen Bedingungen wird RPMI-Medium (mit den oben angegebenen Zusätzen) hinzu gegeben und die Inkubation für weitere 14 Stunden fortgesetzt. Die Zellen werden mit Opti-MEM-Medium gewaschen und anschließend erneut nach dem oben beschriebenen Protokoll transfiziert. Nach jeder Transfektion wird die Transfektionseffizienz mittels FACS-Analyse beurteilt.

15

20

An.139/Renz/Sel

Anschließend wird die Aktivität der DNAzyme durch Nachweis der GATA-3 Proteinmenge im Westernblot überprüft (siehe Figur 6).

Für Westernblot-Analysen werden die zytoplasmatischen Proteine und die Kernproteine mittels Protein-Extraction-Kit nach Herstellerangaben (Pierce) getrennt aufgearbeitet. Die Proteinkonzentration wird mit dem BCA-Kit (Pierce) bestimmt. Die Auftrennung von jeweils 30 µg Protein erfolgt mittels denaturierender Gel-Elektrophorese in 10 %igen SDS-Polyacrylamide-Gelen. Die Proteine werden anschließend nach Standardverfahren auf Nitrocellulose-Membranen geblottet. Die Membranen werden mit 5 % Magermilchpulver in PBS (mit 0,01 % Tween 20) geblockt und anschließend mit Maus-Anti-GATA-3 Antikörpern (Santa Cruz) (1:500) und darauf folgend mit HRP-gekoppelten Maus-Anti-Kaninchen Antikörpern (BD Biosciences) (1:2000) für jeweils eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteine werden mittels Chemilumineszenz visualisiert. Durch den parallelen Nachweis von Beta-Aktin auf den Blots werden Variationen in der Proteinauftragsmenge kontrolliert. Dafür wird auf der Nitrozellulose-Membran zuerst GATA-3 detektiert. Anschließend wird dieselbe Membran über Nacht in einer feuchten Kammer belassen. Nach 2 maligem Waschen mit PBS erfolgt der Nachweis von β -Aktin durch Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern (Maus-anti-Human Beta-Aktin Antikörper (Sigma)).

Figur 6 zeigt das Resultat des Immunblot mit dem Ergebnis der Aktivität der DNAzyme in Zellen. Jurkat E6.1 Zellen werden mittels Lipofektion mit DNAzymen (Spur 4=hgd11-M, Spur 5=hgd13-M, Spur 6=hgd17-M, Spur 7=hgd40-M) transfiziert. Als Kontrollen werden nicht behandelte (Spur 1), nur mit Transfektionsmedium (Spur 2), beziehungsweise mit DNAzymen ohne Transfektionsmedium (Spur 3) behandelte Zellen eingesetzt. Nach 48h Inkubation werden die solubilisierten Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und GATA-3 (A) durch Immunblot mit spezifischen Antikörpern detektiert. Um zu bestätigen, dass in jeder Spur die gleiche Menge an Protein eingesetzt wird, erfolgt auf der gleichen Blot-Membran eine Immunfärbung mit β -Aktin (B). Ein mitgeführter Längenstandard (nicht dargestellt) zeigt Proteinbanden der Größe 63,8 kDa, 49,5 kDa und 37,4 kDa.

An.139/Renz/Sel

Es zeigt sich, dass die DNAzyme hgd11, hgd13 und hgd17 in vivo nicht aktiv sind, wohingegen das DNAzyme hgd40 die GATA-3 Expression auch in vivo inhibiert.

Die spezifische Inhibition der GATA-3 Expression in vivo durch das DNAzyme hgd40 stellt somit ein effektives therapeutisches Werkzeug zur Behandlung von

5 chronisch entzündlichen Erkrankungen dar.

d) Formulierung der spezifischen Ribonukleinsäure aus Schritt b) und/oder einer Zielzelle aus Schritt c) in einem Arzneimittel

10

Die Analyse verschiedener DNAzyme mit für GATA-3 spezifischer Substratbindedomäne zeigt, dass DNAzyme hgd40 die GATA-3 Expression in vivo spezifisch inhibiert und als spezifische Ribonukleinsäure zur Herstellung eines Zell- und/oder Gewebe- und/oder Krankheitsphasen-spezifischen Arzneimittels geeignet ist.

15

Dazu wird hgd40 (5'-GTGGATGGAggctagctacaacgaGTCTTGGAG) oder mit hgd40 transfizierte Zellen in einer pharmazeutischen Komposition mit einem pharmazeutisch akzeptablen Carrier beispielsweise Liposome oder bioabbaubare Polymere versehen.

20

Alternativ zu den DNAzymen wird zur spezifischen Inhibition der GATA-3 Expression und zur Herstellung eines Zell- und/oder Gewebe- und/oder Krankheitsphasen-spezifischen Arzneimittels der Einsatz von zu siRNA vorgeschlagen.

Vorzugsweise wird siRNA zur Inhibition von Maus und humanem GATA-3 eingesetzt. Die Herstellung der siRNA ist dem Fachmann bekannt und in der Literatur

25

beschrieben. Beispiele für siRNA Sequenzen sind unten aufgeführt:

Quelle	Nukleinsäuresequenzen
Maus GATA-3	Sense-Strang: CAUCGAUGGUCAAGGCAACdTdT Antisense-Strang: GUUGCCUUGACCAUCGAUGdTdT
Humane GATA-3 Sequenz 1	Sense-Strang: CAUCGACGGUCAAGGCAACdTdT Antisense-Strang: GUUGCCUUGACCGUCGAUGdTdT

An.139/Renz/Sel

td1 bis td78, so dass eine unterschiedlich spezifische Bindung mittels Watson-Crick Paarung an die T-bet mRNA erfolgt.

Da aus der Literatur bekannt ist, dass DNAzyme die Ziel-mRNA an Purin-Uracil-Bindungen effektiver spalten als Purin-Cytosin-Bindungen, werden vorzugsweise

- 5 DNAzyme konstruiert, die an Purin-Uracil-Bindungen spalten.

Das in Figur 2 gezeigte Modell kann in seiner Funktionsweise auf die Bindung der DNAzyme td1 bis td78 an T-bet mRNA übertragen werden.

Die DNAzyme td1 bis td78 werden für in vitro Versuche unmodifiziert eingesetzt, für Versuche in Zellkultur mit für GATA-3 genannten Modifikationen versehen.

10

Zur Darstellung der Spaltungseigenschaften der DNAzyme und funktionellen Inaktivierung der Ziel mRNA der T-bet mRNA erfolgt in vitro Transkription der T-bet-mRNA aus humanem EDTA Vollblut mittels QIAamp-RNA-Blood-Mini-Kit (Qiagen, Deutschland) nach Herstellerangaben.

- 15 Figur 8 zeigt die Nukleotidsequenz von humanem T-bet, wie es der Datenbankeinträgen [PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>)] Nr.: NM_013351, Sequenz 1 zu entnehmen ist.

- Die reverse Transkription erfolgt mit dem Forward-Primer CGGCCCGCTGGA-GAGGAAGC und Reverse-Primer CACACACCCACACACAACC nach Standardvorschrift (ThermoScript von Invitrogen), wobei ein PCR-Produkt mit einer Länge
20 von 2450 Nukleotiden amplifiziert wird. Dieses PCR-Produkt wird mittels Standardverfahren in das Plasmid pBluescript-SK (Stratagene) kloniert und zur Überprüfung sequenziert.

- Figur 8 zeigt einen Vergleich der Nukleinsäuresequenz von T-bet Nr.: NM_013351
25 (Sequenz 1) und sequenzierter Sequenz (Sequenz 2). Dabei zeigt sich, dass beide Sequenzen nicht vollkommen identisch sind, sondern einzelne Basen ausgetauscht sind. Die Nukleinsäuresequenz 2 von T-bet aus Figur 8 bildet in dieser Erfindung die Grundlage für die Konstruktion von DNAzymen gegen T-bet mRNA.

- 30 Figur 8 A zeigt die Nukleotidsequenz der Sequenz 1 des humanen T-bet-Gen aus Figur 8 und darin als graue Hinterlegung eingezeichnet jeweils zwei Nukleotide GT bzw. AT, zwischen denen weitere potentielle DNAzym-Schnittstellen liegen.

An.139/Renz/Sel

Die Herstellung von T-bet mRNA erfolgt nach Linearisierung des T-bet enthaltenen Plasmids pBluescript-SK durch Spaltung mit dem Restriktionsenzym *Xba* I (Fermentas) und durch in-vitro-Transkription nach Herstellerangaben (Ambion). T-bet mRNA liegt mit einer Länge von insgesamt 2550 Nukleotiden vor.

5.

Die in vitro Spaltungsexperimente von T-bet mRNA mit den DNAsymen (td1 bis td78) werden entsprechend den Angaben zu GATA-3 durchgeführt und analysiert.

Figur 9 zeigt als Ergebnis der Gelelektrophorese die Spaltung der T-bet Ziel-mRNA mit modifizierten DNAsymen [td54-M (Spur 3), td69-M (Spur 4), td70-M

10 (Spur 5)]. Spur 2 enthält als Kontrolle T-bet Ziel-mRNA ohne DNAsym-Zugabe.

Ein mitgeführter Längenstandard (Spur M) zeigt Bandengrößen von 2000 bp und 3000 bp. Pfeile zeigen auf A, die Bande mit dem Substrat (hier T-bet mRNA) und auf B eines der beiden Spaltprodukte (das andere Spaltprodukt ist auf dieser Abbildung nicht zu sehen).

15

Der Vergleich zwischen allen 78 DNAsymen zeigt, dass td54, td69 und td70 besonders aktiv sind, die Modifikationen die Effektivität der DNAsyme nicht herabsetzen.

Die folgende Tabelle zeigt die Einteilung der DNAsyme td 1 bis td 78 gegen t-bet-

20 3 mRNA in 4 Gruppen. Diese Gruppeneinteilung erfolgt aufgrund durchgeführter in-vitro Aktivitätstestungen der DNAsyme gegen t-bet mRNA. Gruppe 1: hohe Spaltungsaktivität, Gruppe 2: mittlere Spaltungsaktivität, Gruppe 3: schwache Spaltungsaktivität und Gruppe 4: keine messbare Spaltungsaktivität.

Gruppe	td	Aktivität gegen t-bet mRNA
1	54, 69, 70	Hohe Spaltungsaktivität
2	21, 24, 28, 29, 30, 45, 71, 72, 77, 78	Mittlere Spaltungsaktivität
3	13, 19, 22, 23, 25, 27, 31, 32, 44, 46, 47, 48, 50, 51, 53, 55, 56, 57, 58, 60, 61, 62, 65, 67, 68, 73, 74, 75	Schwache Spaltungsaktivität
4	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 26, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 49, 52, 59, 63, 64, 66, 76	Keine Spaltungsaktivität

25

An.139/Renz/Sel

c) Einbringen der spezifischen Ribonukleinsäure Moleküle aus Schritt b) in Zielzellen

Die DNAzyme td54, td69 und td70 werden mit und ohne die beschriebenen Modifikationen in Zielzellen verwendet. Die Angaben zur Transfektion von Jurkat E6.1

- 5 Zellen entsprechen denen zu dem Ausführungsbeispiel GATA-3.

Nach der Transfektion von Jurkat E6.1 Zellen wird die T-bet-mRNA Menge relativ zu GAPDH-mRNA Expression mittels Real-Time-PCR (LightCycler, Roche) quantitativ bestimmt, um Aussagen über die in vitro Effektivität der DNAzyme zu erhalten.

- 10 Für LightCycler-Analysen wird die RNA aus den Jurkat E6.1 Zellen mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen, Deutschland) gereinigt und nachfolgend photometrisch normalisiert. Nach reverser Transkription mit SuperScript II (Gibco) laut Herstellerangaben, folgt die quantitative Analyse der T-bet- und GAPDH-mRNA im LightCycler. Das Gesamtvolumen für die PCR ist 20µl, darin enthalten sind 1µl DNA, je 1µl
15 (0,5µM) Sense- und Antisense-Primer sowie 10µl QuantiTect-SYBR-Green-PCR-Master-Mix (Qiagen, Deutschland). Die verwendeten PCR-Primer für T-bet sind: Sense 5'-CCCACCATGTCCTACTACCG-3'; Antisense 5'-

GCAATCTCAGTCCACACCAA-3'. Die PCR-Primer für GAPDH sind: Sense 5'-TCTTCTTTTTCGTCGCCAG-3' und Antisense 5'-AGCCCCAGCCTTCTCCA-3'.

- 20 Die PCR Konditionen sind: Denaturierung (15min 95°C), Amplifikation (15sec 95°C, 25sec 59°C, 25sec 72°C von 50 Zyklen) dann Final-Extension 2min 72°C. Die anschließende Schmelzkurve wird folgendermaßen generiert: 0sec 95°C, 15sec 60°C dann wird die Temperatur in 0,2°C Schritten erhöht auf 97°C, gleichzeitig wird kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Die Schmelzkurve dient der
25 internen Kontrolle, da alle PCR-Produkte eine spezifische Schmelztemperatur haben.

- SYBR-Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff (enthalten im QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix), der an doppelsträngige DNA bindet. Wenn während der Extension die DNA verdoppelt wird, bindet SYBR-Green daran und generiert ein
30 dungsabhängiges Fluoreszenzsignal, welches vom LightCycler am Ende jeder Extension detektiert wird. Je höher die Menge an Ausgangsmaterial, desto früher wird die signifikante Erhöhung der Fluoreszenz detektiert. Die LightCycler Software stellt gesammelte Fluoreszenz-Intensitäten gegen die Zyklen graphisch dar.

An.139/Renz/Sel

In der Figur 10 sind T-bet- und GAPDH-mRNA LightCycler Amplifikationskurven nach der Behandlung von Jurkat E6.1 Zellen mit den DNAzyme td54m, td69m und td70m im Vergleich zu Nonsens-DNAzym behandelten, dargestellt.

Der jeweilige „Crossing Point“ (Ct), definiert als der PCR-Zyklus, bei dem sich die

5 Fluoreszenz zum erstmals signifikant von der Hintergrund-Fluoreszenz unterscheidet, wird manuell mit der Fit-Point Methode der LightCycler Software bestimmt. Die relative Quantifizierung von T-bet- und GAPDH-mRNA in mit DNAzymen behandelten Zellen im Vergleich zu Nonsense-DNAzym behandelten Zellen wird nach der im User Bulletin #2 (ABI Prism 7700 Sequence detection System
10 User Bulletin #2 (2001) Relative quantification of gene expression <http://docs.appliedbiosystems.com/peblodocs/04303859.pdf>) beschriebenen Anleitung durchgeführt. Dabei werden die Menge an T-bet-mRNA aus dem Kontrollversuch gleich 100% gesetzt. Die Daten der relativen Quantifizierung sind in der Figur 11 graphisch dargestellt.

15 Im Vergleich zur Nonsense-DNAzym Behandlung zeigt sich, dass das td69m-DNAzyme zu einer Suppression von 81,3% und das td70m-DNAzyme zu einer Suppression von 81,0% führt, wohingegen das td54m-DNAzym keinen suppressiven Effekt auf T-bet mRNA hat.

Das bedeutet, dass das td54m-DNAzym in vivo nicht aktiv ist, wohingegen td69m-
20 und td70m-DNAzyme auch im zellulären Milieu die mRNA von T-bet inaktivieren. Die spezifische Reduktion der T-bet mRNA in vivo durch die DNAzyme td69m und td70m stellt somit ein effektives therapeutisches Werkzeug zur Behandlung von chronisch entzündlichen Erkrankungen dar.

25

d) Formulierung der spezifischen Ribonukleinsäure aus Schritt b) und/oder einer Zielzelle aus Schritt c) in einem Arzneimittel

Die Analyse verschiedener DNAzyme mit für T-bet spezifischer Substratbindedomäne zeigt, dass DNAzyme td69 und td70 die T-bet Expression in vivo spezifisch inhibieren und als spezifische Ribonukleinsäure zur Herstellung eines Zell-
30 und/oder Gewebe- und/oder Krankheitsphasen-spezifischen Arzneimittels geeignet sind.

An.139/Renz/Sel

Dazu wird td69 (GGCAATGAaggctagctacaacgaTGGGTTTCT) oder td70 (TCACGGGAaggctagctacaacgaGAACTGGGT) oder mit td69m bzw. td70m trans-fizierte Zellen in einer pharmazeutischen Komposition mit einem pharmazeutisch akzeptablen Carrier beispielsweise Liposome oder bioabbaubare Polymere ver-
5 sehen.

Alternativ zu den DNAzymen wird zur spezifischen Inhibition der T-bet Expression und zur Herstellung eines Zell- und/oder Gewebe- und/oder Krankheitsphasen-spezifischen Arzneimittels der Einsatz von siRNA vorgeschlagen.

- 10 Vorzugsweise handelt es sich um siRNA zur Inhibition von humanem T-bet. Die Herstellung der siRNA ist dem Fachmann bekannt und in der Literatur beschrieben. Ein Beispiel für siRNA Sequenzen:

Quelle	Nukleinsäuresequenzen
Human T-bet	Sense-Strang: UCAGCACCAGACAGAGAUGdTdT Antisense-Strang: CAUCUCUGUCUGGUGCUGAdTdT

- 15 Dem Fachmann ist ersichtlich, dass mit dem Wissen der vorliegenden Erfindung auch leicht spezifische DNAzyme bzw. siRNAs als Arzneimittel bei chronisch ent-zündlichen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen herstellbar sind, die ge-gen weitere Transkriptionsfaktoren gerichtet sind, die eine Rolle bei der Differen-zierung zu TH1- beziehungsweise TH2-Zellen spielen beispielsweise STAT4,
20 STAT5a, STAT1, c-Rel, CREB2, ATF-2, ATF-2, Hlx, IRF-1, c-Maf, NFAT, NIP45, AP1, Me1-18, SKAT-2, CTLA-4 oder die gegen weitere Faktoren der Signaltrans-duktionswege zur Differenzierung und/oder Expression von Zytokinen gerichtet sind, beispielsweise Src kinase, Tec kinase, Rlk (Txk im Menschen), Itk, Tec, RIBP, PLCy, MAP kinase, ERK, JNK, P38, MKK, MKK1, MKK2, MKK3, MKK4,
25 MKK6, MKK7, Rac2, GADD45, GADD45 β , GADD45 γ , SOCS, CIS, SOCS1, SOCS2, SOCS3, JAK, JAK1, JAK3, NIP45.

Diese Proteine weisen eine Expression auf, die in einer Zielzelle im Vergleich zur Expression einer Kontrollzelle erhöht ist.

An.139/Renz/Sel

Ansprüche

- 5
1. Verfahren zur Herstellung eines Zell- und/oder Gewebe- und/oder Krankheitsphasen-spezifischen Arzneimittels, gekennzeichnet durch die Schritte,
- 10
- a) Identifikation von Ribonukleinsäure-Molekülen, deren Expression sich in einer Zielzelle im Vergleich zur Expression einer Kontrollzelle unterscheidet
- b) Design von spezifischen Ribonukleinsäure-Molekülen, die an Ribonukleinsäure Moleküle aus Schritt a) binden und sie funktionell inaktivieren
- 15
- c) Einbringen der spezifischen Ribonukleinsäure-Moleküle aus Schritt b) in Zielzellen
- d) Formulierung der spezifischen Ribonukleinsäure-Moleküle aus Schritt b) und/oder einer Zielzelle aus Schritt c) in einem Arzneimittel
- 20
2. Verfahren gemäß Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch dass die Zielzelle eine Zelle ist, die Transkriptionsfaktoren und/oder Hormone und/oder Zytokine und/oder Wachstumsfaktoren sezerniert und/oder charakteristische Oberflächenrezeptoren aufweist.
- 25
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch dass die Kontrollzelle eine gesunde Zelle des Zielgewebes oder eine typgleiche Zelle aus anderen Kompartimenten desselben Patienten ist.
- 30
4. Verfahren gemäß Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch dass Ribonukleinsäure-Moleküle isoliert werden, deren Expression in einer Zielzelle im Vergleich zur Expression einer Kontrollzelle erhöht ist.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch dass die Ribonukleinsäure-Moleküle, deren Expression in einer Zielzelle im Vergleich zur Expression einer Kontrollzelle erhöht ist, ausgewählt ist aus STAT4, STAT5a, STAT1, c-Rel, CREB2, ATF-2, Hlx, IRF-1, c-Maf,

An.139/Renz/Sel

NFAT, NIP45, AP1, Mel-18, SKAT-2, CTLA-4, Src kinase, Tec kinase, Rlk (Txk im Menschen), Itk, Tec, RIBP, PLC γ , MAP kinase, ERK, JNK, P38, MKK, MKK1, MKK2, MKK3, MKK4, MKK6, MKK7, Rac2, GADD45, GADD45 β , GADD45 γ , SOCS, CIS, SOCS1, SOCS2, SOCS3, JAK, JAK1, JAK3, NIP45 mRNA sind.

6. Verfahren gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, dass die Ribonukleinsäure-Moleküle, deren Expression in einer Zielzelle im Vergleich zur Expression einer Kontrollzelle erhöht ist, GATA-3 mRNA sind.
7. Verfahren gemäß Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch dass die Ribonukleinsäure-Moleküle, deren Expression in einer Zielzelle im Vergleich zur Expression einer Kontrollzelle erhöht sind T-bet mRNA ist.
8. Verfahren gemäß Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch dass die spezifischen Ribonukleinsäure Moleküle, die an GATA-3 mRNA binden und sie funktionell inaktivieren RNA-inaktivierende-DNA-Enzyme (DNAzyme) oder Small-Interfering-RNA (siRNA) sind.
9. Verfahren gemäß Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch dass die spezifischen Ribonukleinsäure Molekülen, die an T-bet mRNA binden und sie funktionell inaktivieren RNA-inaktivierende-DNA-Enzyme (DNAzyme) oder Small-Interfering-RNA (siRNA) sind.
10. DNAzyme, das spezifisch GATA-3 mRNA spaltet, bestehend aus
 - einer katalytischen Domäne mit der Nukleotidsequenz GGCTAGCTA-CAACGA, die mRNA an jeder Purin:Pyrimidin Schnittstelle schneidet, an der sie gebunden ist
 - einer rechten Substratbindedomäne, die sich am 3'-Ende der katalytischen Domäne anschließt und
 - einer linken Substratbindedomäne, die sich am 5'-Ende der katalytischen Domäne anschließt,

An.139/Renz/Sel

wobei die beiden Substratbindedomänen jeweils komplementär zu zwei Regionen der GATA-3 mRNA sind, so dass sie mit der mRNA hybridisieren.

5 11. DNAzym, gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass es die Sequenz hgd 40 GTGGATGGA GGCTAGCTACAA CGAGTCTTGGAG hat.

10 12. DNAzym, das spezifisch T-bet mRNA spaltet, bestehend aus
- einer katalytischen Domäne mit der Nukleotidsequenz GGCTAGCTA-
CAACGA, die mRNA an jeder Purln:Pyrimidin Schnittstelle schneidet,
an der sie gebunden ist
- einer rechten Substratbindedomäne, die sich am 3'-Ende der katalyti-
schen Domäne anschließt und
15 - einer linken Substratbindedomäne, die sich am 5'-Ende der katalyti-
schen Domäne anschließt,
wobei die beiden Substratbindedomänen jeweils komplementär zu zwei
Regionen der T-bet mRNA sind, so dass sie mit der mRNA hybridisie-
ren.

20 13. DNAzym, gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass es die
Sequenzen td69 GGCAATGAA GGCTAGCTACAACGA TGGGTTTCT
oder td70 TCACGGCAA GGCTAGCTACAACGA GAACTGGGT hat.

25 14. DNAzym, gemäß der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekenn-
zeichnet, dass sie modifiziert sind.

30 15. DNAzym, gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Modi-
fikation ein inverses Thymidin am 3'-Ende und /oder eine FAM-
Markierung am 5'-Ende ist.

16. Arzneimittel enthaltend ein DNAzym gemäß der Ansprüche 10 bis 15
und einen pharmazeutisch akzeptablen Carrier.

An.139/Renz/Sel

17. Arzneimittel gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass der pharmazeutisch akzeptablen Carrier aus der Gruppe der Liposome und bioabbaubaren Polymeren stammt.

5

18. Verwendung eines DNAzym-haltigen Arzneimittels gemäß der vorangegangenen Ansprüche zur Behandlung von chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen.

10

An.139/Renz/Sel

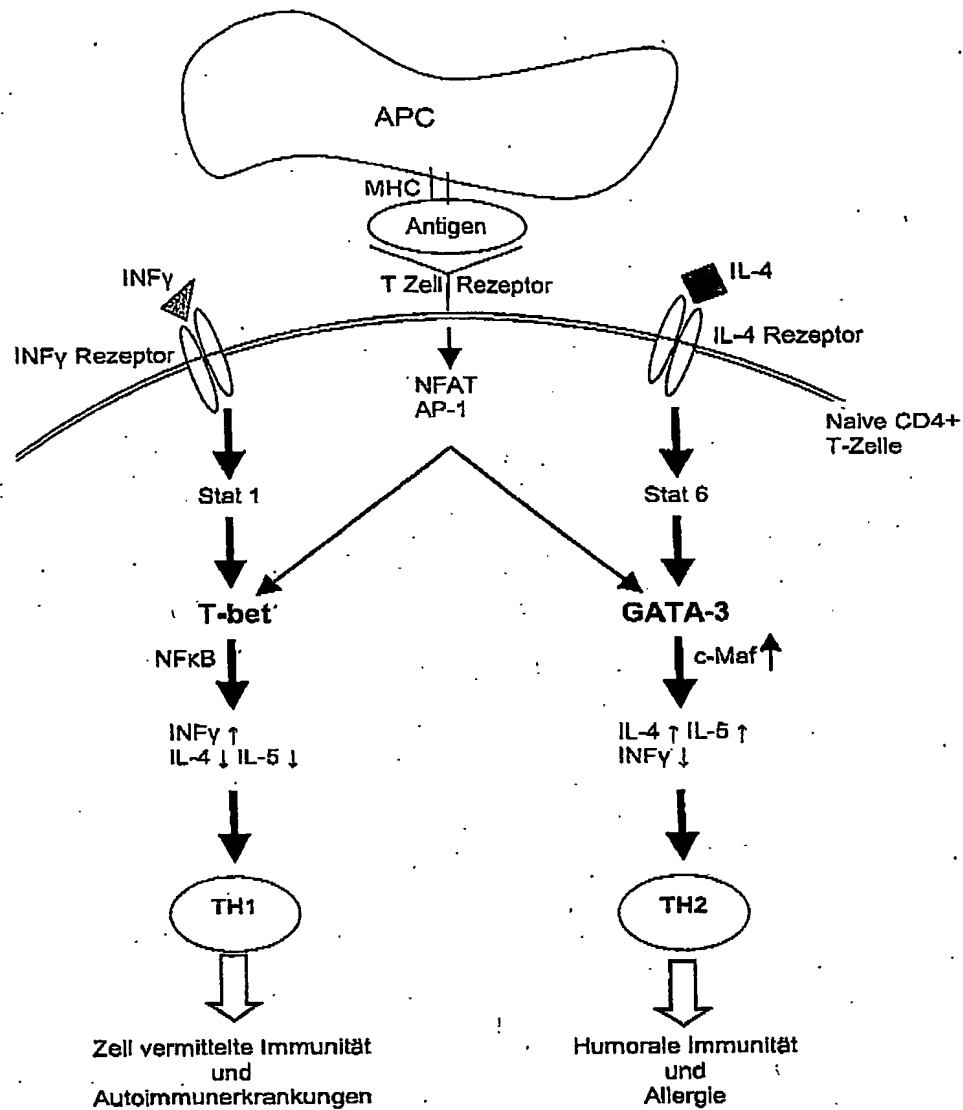


Fig. 1



Fig. 3

Name	DNAzyme Sequenz
hgd1	5'-TCGGTCAGAggctagctacaacgaTGC GTTGCT-3'
hgd2	5'-GGCGTACGAggctagctacaacgaCTGCTCGGT-3'
hgd3	5'-GGCGGCGTAggctagctacaacgaGACCTGCTC-3'
hgd4	5'-CTCGGGTCAggctagctacaacgaCTGGGTAGC-3'
hgd5	5'-TCCTCTGCAggctagctacaacgaCGGGGTCCT-3'
hgd6	5'-ACTCTGCAAggctagctacaacgaTCTGCGAGC-3'
hgd7	5'-GGGCGACGAggctagctacaacgaTCTGCAATT-3'
hgd8	5'-AAGGGGCGAggctagctacaacgaGACTCTGCA-3'
hgd9	5'-AAAACGGGAggctagctacaacgaCAGGTTGTA-3'
hgd10	5'-AGAATAAAAggctagctacaacgaGGGACCAGG-3'
hgd11	5'-ATGGCAGAAggctagctacaacgaAAAACGGGA-3'
hgd12	5'-AATGGGTAggctagctacaacgaGGCAGAATA-3'
hgd13	5'-ATCCAAAAAggctagctacaacgaTGGGTATGG-3'
hgd14	5'-AGGGGAAGAggctagctacaacgaAAAAATCCA-3'
hgd15	5'-TTTTAAAAAggctagctacaacgaTATCTTGA-3'
hgd16	5'-GTGGGGGGAggctagctacaacgaGGGAAGGCT-3'
hgd17	5'-GTTGAATGAggctagctacaacgaTTGCTTTCG-3'
hgd18	5'-GTCGTTGAAggctagctacaacgaGATTTGCTT-3'
hgd19	5'-GGCCCGGAAggctagctacaacgaCCGCGCGCG-3'
hgd20	5'-TCACCTCCAggctagctacaacgaGGCCTCGGC-3'
hgd21	5'-CCGCCGTCAggctagctacaacgaCTCCATGGC-3'
hgd22	5'-GGTGGCTCAGgctagctacaacgaCCAGCGCGG-3'
hgd23	5'-CGTTGAGCAGgctagctacaacgaGGCGGGGTG-3'
hgd24	5'-CCGCGTCCAggctagctacaacgaGTAGGAGTG-3'
hgd25	5'-CAGCGGGTAggctagctacaacgaTGCGCCGCG-3'
hgd26	5'-GCACATCCAggctagctacaacgaCTCCTCCGG-3'
hgd27	5'-AAAAGCACAggctagctacaacgaCCACCTCCT-3'
hgd28	5'-TAAAAAGCAGgctagctacaacgaATCCACCTC-3'
hgd29	5'-GACCGTCGAggctagctacaacgaGTTAAAAAG-3'
hgd30	5'-TTGCCTTGAggctagctacaacgaCGTCGATGT-3'
hgd31	5'-AGGGCGGGAggctagctacaacgaTG GTTGCC-3'
hgd32	5'-TGGCCCTGAggctagctacaacgaCGAGTTTCC-3'
hgd33	5'-ACCTCTGCAggctagctacaacgaCGTGGCCCT-3'
hgd34	5'-CGGAGGGTAggctagctacaacgaCTCTGCACC-3'
hgd35	5'-GGCGGCACAggctagctacaacgaCTGGCTCCC-3'
hgd36	5'-CGGGCGGCAGgctagctacaacgaACCTGGCTC-3'
hgd37	5'-AGGGATCCAggctagctacaacgaGAAGCAGAG-3'
hgd38	5'-GGGTAGGGAggctagctacaacgaCCATGAAGC-3'
hgd39	5'-GGGCTGAGAggctagctacaacgaTCCAGGGGG-3'
hgd40	5'-GTGGATGGAggctagctacaacgaGTCTTGGAG-3'
hgd41	5'-CGTGGTGGAggctagctacaacgaGGACGTCTT-3'
hgd42	5'-GGGGGTAGAggctagctacaacgaGGAGAGGGG-3'
hgd43	5'-GGAGGAGGAggctagctacaacgaGAGGCCGGG-3'
hgd44	5'-GCCCCCGAggctagctacaacgaAAGGAGGAG-3'
hgd45	5'-CCGGGGAGAggctagctacaacgaGTCTTCCGG-3'
hgd46	5'-GGACAGCGAggctagctacaacgaGGGTCCGGG-3'
hgd47	5'-TGGGGTGGAggctagctacaacgaAGCGATGGG-3'
hgd48	5'-CTTGAGGCAGgctagctacaacgaTCTTTCTCG-3'
hgd49	5'-CACCTGGTAggctagctacaacgaTTGAGGCAC-3'

Name	DNAzyme Sequenz
hgd50	5'-GCAGGGGCaggctagctacaacgaCTGGTACTT-3'
hgd51	5'-CCAGCTTCaggctagctacaacgaGCTGTCGGG-3'
hgd52	5'-GTGGGACGaggctagctacaacgaTCCAGCTTC-3'
hgd53	5'-GGAGTGGGAggctagctacaacgaGACTCCAGC-3'
hgd54	5'-ATGCTGCCAggctagctacaacgaGGGAGTGGG-3'
hgd55	5'-GGGCGGTCAggctagctacaacgaGCTGCCACG-3'
hgd56	5'-GAGGCTCCAggctagctacaacgaCCAGGGCGG-3'
hgd57	5'-GTGGGTCGAggctagctacaacgaGAGGAGGCT-3'
hgd58	5'-AGGTGGTGAggctagctacaacgaGGGGTGGTG-3'
hgd59	5'-ACTCGGGCaggctagctacaacgaGTAGGGCGG-3'
hgd60	5'-GGAGCTGTAggctagctacaacgaTCGGGCACG-3'
hgd61	5'-GGACTTGCaggctagctacaacgaCCGAAGCCG-3'
hgd62	5'-GGGCCTGGAggctagctacaacgaTTGCATCCG-3'
hgd63	5'-TGTGCTGGAggctagctacaacgaCGGGCCTTG-3'
hgd64	5'-GTTACACAggctagctacaacgaTCCCTGCCT-3'
hgd65	5'-CAGTTCACaggctagctacaacgaACTCCCTGC-3'
hgd66	5'-CACAGTTCAggctagctacaacgaACACTCCCT-3'
hgd67	5'-GTTGCCCCAggctagctacaacgaAGTTCACAC-3'
hgd68	5'-TCGCCGCCAggctagctacaacgaAGTGGGGTC-3'
hgd69	5'-CCCGTGCCAggetagctacaacgaCTCGCCGCC-3'
hgd70	5'-GGCGTTGCaggctagctacaacgaAGGTAGTGT-3'

Multiple Sequence Alignments GATA-3

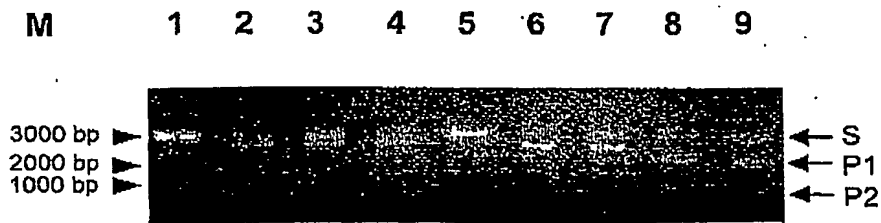
FAXG3 Nr: 295258 von NVS:FAXG3.I0.0202/06419436499 an NVS:PRINTER.0101/LEXMARK2450 (Seite 15 von 28)
Datum 02.10.03 12:56 - Status: Server MRSDPAM02 (MRS 4.00) übernahm Sendeauftrag
Betreff: 28 Seite(n) empfangen

Sequenz_1	1080	TCCGCCCGGAGGACG AGAAAGAGTGCCTCAAGTACCAGGTGCCCTTCCCGGACAGCATG	1139
Sequenz_2	674	TCCGCCCGGAGGACG AGAAAGAGTGCCTCAAGTACCAGGTGCCCTTCCCGGACAGCATG	733
Sequenz_3	1081	TCCGCCCGGAGGACG AGAAAGAGTGCCTCAAGTACCAGGTGCCCTTCCCGGACAGCATG	1140
Sequenz_1	1140	AAGCTGGAGTCGTCCC ACTCCCGTGGCAGCATGACCGCCCTGGGTGGAGCCTCTCTGTCC	1199
Sequenz_2	734	AAGCTGGAGTCGTCCC ACTCCCGTGGCAGCATGACCGCCCTGGGTGGAGCCTCTCTGTCC	793
Sequenz_3	1141	AAGCTGGAGTCGTCCC ACTCCCGTGGCAGCATGACCGCCCTGGGTGGAGCCTCTCTGTCC	1200
Sequenz_1	1200	ACCCACACCCCATCA CCACCTACCCGCCCTACGTGCCCGAGTACAGCTCCGGACTCTTC	1259
Sequenz_2	794	ACCCACACCCCATCA CCACCTACCCGCCCTACGTGCCCGAGTACAGCTCCGGACTCTTC	853
Sequenz_3	1201	ACCCACACCCCATCA CCACCTACCCGCCCTACGTGCCCGAGTACAGCTCCGGACTCTTC	1260
Sequenz_1	1260	CCCCCAGCAGCCTGC TGGGCGGCTCCCCACCGGCTTCGGATGCAAGTCCAGGCCAAG	1319
Sequenz_2	854	CCCCCAGCAGCCTGC TGGGCGGCTCCCCACCGGCTTCGGATGCAAGTCCAGGCCAAG	913
Sequenz_3	1261	CCCCCAGCAGCCTGC TGGGCGGCTCCCCACCGGCTTCGGATGCAAGTCCAGGCCAAG	1320
Sequenz_1	1320	GCCCGGTCCAGCACAG AAGGCAGGAGTGTGTGAAGTGTGGGGCAACCTCGACCCCACTG	1379
Sequenz_2	914	GCCCGGTCCAGCACAG ---GCAGGAGTGTGTGAAGTGTGGGGCAACCTCGACCCCACTG	970
Sequenz_3	1321	GCCCGGTCCAGCACAG AAGGCAGGAGTGTGTGAAGTGTGGGGCAACCTCGACCCCACTG	1380
Sequenz_1	1380	TGGCGGCGAGATGGCA CGGGACACTACCTGTGCAACGCTGCGGGCTCTATCACAAAATG	1439
Sequenz_2	971	TGGCGGCGAGATGGCA CGGGACACTACCTGTGCAACGCTGCGGGCTCTATCACAAAATG	1030
Sequenz_3	1381	TGGCGGCGAGATGGCA CGGGACACTACCTGTGCAACGCTGCGGGCTCTATCACAAAATG	1440
Sequenz_1	1440	AACGGACAGAACCGGC CCCTCATTAAGCCCAAGCGAAGGCTGTCTGCAGCCAGGAGAGCA	1499
Sequenz_2	1031	AACGGACAGAACCGGC CCCTCATTAAGCCCAAGCGAAGGCTGTCTGCAGCCAGGAGAGCA	1090
Sequenz_3	1441	AACGGACAGAACCGGC CCCTCATTAAGCCCAAGCGAAGGCTGTCTGCAGCCAGGAGAGCA	1500
Sequenz_1	1500	GGGACGTCTGTGCGA ACTGTGAGACCCACCAACCACTCTGGAGGAGGAATGCCAAT	1559
Sequenz_2	1091	GGGACGTCTGTGCGA ACTGTGAGACCCACCAACCACTCTGGAGGAGGAATGCCAAT	1150
Sequenz_3	1501	GGGACGTCTGTGCGA ACTGTGAGACCCACCAACCACTCTGGAGGAGGAATGCCAAT	1560
Sequenz_1	1560	GGGACCTCTGTGCGA ATGCTGTGGGCTCTACTACAAGCTTCACAATATTACAGACCC	1619
Sequenz_2	1151	GGGACCTCTGTGCGA ATGCTGTGGGCTCTACTACAAGCTTCACAATATTACAGACCC	1210
Sequenz_3	1561	GGGACCTCTGTGCGA ATGCTGTGGGCTCTACTACAAGCTTCACAATATTACAGACCC	1620
Sequenz_1	1620	CTGACTATGAAGAAGG AAGGCATCCAGACCAGAAACCGAAAATGTCTAGCAAAATCCAAA	1679
Sequenz_2	1211	CTGACTATGAAGAAGG AAGGCATCCAGACCAGAAACCGAAAATGTCTAGCAAAATCCAAA	1270
Sequenz_3	1621	CTGACTATGAAGAAGG AAGGCATCCAGACCAGAAACCGAAAATGTCTAGCAAAATCCAAA	1680
Sequenz_1	1680	AAGTGCAAAAAGTGC ATGACTCACTGGAGGACTTCCCAAGAACAGCTCGTTTAACCCG	1739
Sequenz_2	1271	AAGTGCAAAAAGTGC ATGACTCACTGGAGGACTTCCCAAGAACAGCTCGTTTAACCCG	1330
Sequenz_3	1681	AAGTGCAAAAAGTGC ATGACTCACTGGAGGACTTCCCAAGAACAGCTCGTTTAACCCG	1740
Sequenz_1	1740	GCCGCCCTCTCCAGAC ACATGTCTCCTCCCTGAGCCACATCTCGCCCTTCAGCCACTCCAGC	1799
Sequenz_2	1331	GCCGCCCTCTCCAGAC ACATGTCTCCTCCCTGAGCCACATCTCGCCCTTCAGCCACTCCAGC	1390
Sequenz_3	1741	GCCGCCCTCTCCAGAC ACATGTCTCCTCCCTGAGCCACATCTCGCCCTTCAGCCACTCCAGC	1800
Sequenz_1	1800	CACATGCTGACCACGC CCACGCGGATGACCCGCCATCCAGCCTGTCTTTGGACCCACAC	1859
Sequenz_2	1391	CACATGCTGACCACGC CCACGCGGATGACCCGCCATCCAGCCTGTCTTTGGACCCACAC	1450
Sequenz_3	1801	CACATGCTGACCACGC CCACGCGGATGACCCGCCATCCAGCCTGTCTTTGGACCCACAC	1860
Sequenz_1	1860	CACCCCTCCAGCATGG TCACCGCCATGGGTTAGAGCCCTGCTCGATGCTCACAGGGCCCC	1919
Sequenz_2	1451	CACCCCTCCAGCATGG TCACCGCCATGGGTTAGAGCCCTGCTCGATGCTCACAGGGCCCC	1510
Sequenz_3	1861	CACCCCTCCAGCATGG TCACCGCCATGGGTTAGAGCCCTGCTCGATGCTCACAGGGCCCC	1920
Sequenz_1	1920	CAGCGAGAGTCCCTGC AGTCCCTTTCCACTTGCATTTTTCAGGAGCAGTATCATGAAGC	1979
Sequenz_2	1511	CAGCGAGAGTCCCTGC AGTCCCTTTCCACTTGCATTTTTCAGGAGCAGTATCATGAAGC	1570
Sequenz_3	1921	CAGCGAGAGTCCCTGC AGTCCCTTTCCACTTGCATTTTTCAGGAGCAGTATCATGAAGC	1980
Sequenz_1	1980	CTAAACGCGATGGATA TATGTTTTTGAAGGCAGAAAGCAAAATTATCTTTGCCACTTTTC	2039
Sequenz_2	1571	CTAAACGCGATGGATA TATGTTTTTGAAGGCAGAAAGCAAAATTATCTTTGCCACTTTTC	1630
Sequenz_3	1981	CTAAACGCGATGGATA TATGTTTTTGAAGGCAGAAAGCAAAATTATCTTTGCCACTTTTC	2040
Sequenz_1	2040	AAAGGAGCTCACTGTG GTGTCTGTGTCCAAACCACTGAATCTGGACCCCATCTGTGAATA	2099
Sequenz_2	1631	AAAGGAGCTCACTGTG GTGTCTGTGTCCAAACCACTGAATCTGGACCCCATCTGTGAATA	1690
Sequenz_3	2041	AAAGGAGCTCACTGTG GTGTCTGTGTCCAAACCACTGAATCTGGACCCCATCTGTGAATA	2100

Sequenz_1	2100	AGCCATTCTGACTCATATCCCCCTATTTAACAGGGTCTCTAGTGTGTGAAAAAAAAA-T	2158
Sequenz_2	1691	AGCCATTCTGACTCATATCCCCCTATTTAACAGGGTCTCTAGTGTGTGAAAAAAAAAAT	1750
Sequenz_3	2101	AGCCATTCTGACTCATATCCCCCTATTTAACAGGGTCTCTAGTGTGTGAAAAAAAAAAT	2160
Sequenz_1	2159	GCTGAACATTGCATATAACTTATATTGTAAAGAACTACTGTACAATGACTTTATTGCATCT	2218
Sequenz_2	1751	GCTGAACATTGCATATAACTTATATTGTAAAGAACTACTGTACAATGACTTTATTGCATCT	1810
Sequenz_3	2161	GCTGAACATTGCATATAACTTATATTGTAAAGAACTACTGTACAATGACTTTATTGCATCT	2220
Sequenz_1	2219	GGGTAGCTGTAAAGGCA TGAAGGATCCCAAGAAAGTTTAAAGGAATATGGGAGAAATACTCTG	2278
Sequenz_2	1811	GGGTAGCTGTAAAGGCA TGAAGGATCCCAAGAAAGTTTAAAGGAATATGGGAGAAATAGTGTG	1870
Sequenz_3	2221	GGGTAGCTGTAAAGGCA TGAAGGATCCCAAGAAAGTTTAAAGGAATATGGGAGAAATAGTGTG	2280
Sequenz_1	2279	GAAATTAAGAGAAAC TAGGTCGTATATTCAAATGGACAACTGCCAGTTTGTTCCTT	2338
Sequenz_2	1871	GAAATTAAGAGAAAC TAGGTCGTATATTCAAATGGACAACTGCCAGTTTGTTCCTT	1930
Sequenz_3	2281	GAAATTAAGAGAAAC TAGGTCGTATATTCAAATGGACAACTGCCAGTTTGTTCCTT	2340
Sequenz_1	2339	TCACTGGCCACAGTTG TTTGATGCATTAAGAGAAATAAAAAAAGAAAAAGAGAAAAG	2398
Sequenz_2	1931	TCACTGGCCACAGTTG TTTGATGCATTAAGAGAAATAAAAAAAGAAAAAGAGAAAAG	1990
Sequenz_3	2341	TCACTGGCCACAGTTG TTTGATGCATTAAGAGAAATAAAAAAAGAAAAA-GAGAAAAG	2399
Sequenz_1	2399	A-----	2399
Sequenz_2	1991	AAAAAAAAAGAAAAA GTTGTAGGCGAATCATTTCTTCAAAGCTGTTGGCCCTCTGCMAA	2050
Sequenz_3	2400	AAAAAAAAAGAAAAA GTTGTAGGCGAATCATTTCTTCAAAGCTGTTGGCC-CTGCAAA	2458
Sequenz_1	****	-----	****
Sequenz_2	2051	GGAAATACCAAGTTCTG GGCATCAGTGTACCGTTCCACCACTGCCATTGAGGGTTTCAG	2110
Sequenz_3	2459	GGAAATACCAAGTTCTG GGCATCAGTGTACCGTTCCACCACTGCCATTGAGGGTTTCAG	2518
Sequenz_1	****	-----	****
Sequenz_2	2111	AGAGCCTTTTCTAGG CCTACATGCTTTGTGAACAGTCCCTGTAATTCCTTTGTATG	2170
Sequenz_3	2519	AGAGCCTTTTCTAGG CCTACATGCTTTGTGAACAGTCCCTGTAATTCCTTTGTATG	2578
Sequenz_1	****	-----	****
Sequenz_2	2171	TATAATTCAAAGCACC AAAATAAGAAAAGATGTAGATTTATTTTCATCATATTATACAGAC	2230
Sequenz_3	2579	TATAATTCAAAGCACC AAAATAAGAAAAGATGTAGATTTATTTTCATCATATTATACAGAC	2638
Sequenz_1	****	-----	****
Sequenz_2	2231	CGAACTGTTCTATAAA TTTATTTACTGCTAGTCTTAAGAACTGCTTTCTTTCTTTCTTT	2290
Sequenz_3	2639	CGAACTGTTCTATAAA TTTATTTACTGCTAGTCTTAAGAACTGCTTTCTTTCTTTCTTT	2698
Sequenz_1	****	-----	****
Sequenz_2	2291	GTTTCAATATTTTCTG TCTCTCTCAATTTTCGGCTTGAATAAACTAGATTACATTCAGTTG	2350
Sequenz_3	2699	GTTTCAATATTTTCTG TCTCTCTCAATTTTCGG-----	2731
Sequenz_1	****	-----	****
Sequenz_2	2351	GCAAAAAAAAAAAAAA	2365
Sequenz_3	****	-----	****

[illegible]

Fig. 4 A

**Fig. 5**

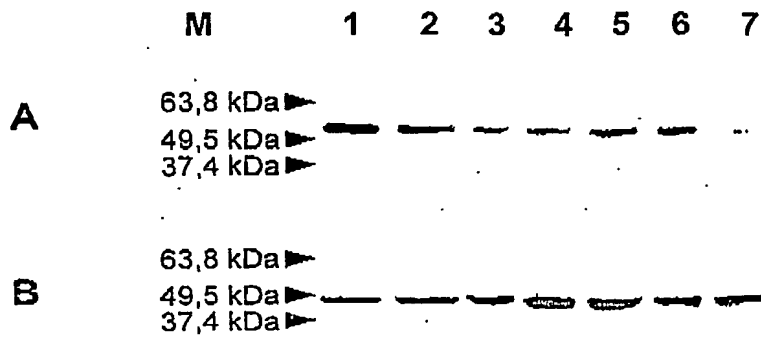
**Fig. 6**

Fig. 7

Name	DNAzyme Sequenz
td1	TGGCTTCTAggctagctacaacgaGCCCTCGTC
td2	GGGCTCTGAggctagctacaacgaGCCTGGCTT
td3	GGGACCCCAggctagctacaacgaCCGAGCCCG
td4	GGTGGGGGAggctagctacaacgaCCCACCGGA
td5	GGCGGGGGAggctagctacaacgaCCGAGGGCC
td6	GGGCTGGGAggctagctacaacgaGGGCAGGGA
td7	CGTCGAGGAggctagctacaacgaCCGCCCCTC
td8	GGGCTGGCAggctagctacaacgaCTTCCCGTA
td9	CGATGCCCCAggctagctacaacgaCCGGGGCGG
td10	GCTCCACGAggctagctacaacgaGCCCATCCG
td11	CCGGCTCCAaggctagctacaacgaGATGCCCAT
td12	TCTCCGCAAggctagctacaacgaCCGGCTCCA
td13	CCGTGAGCAggctagctacaacgaGTCTCCGCA
td14	TCCCCGGCAggctagctacaacgaCGGCTCGGT
td15	CCCCCGCGAggctagctacaacgaGCTCGTCCG
td16	GTAGGGAGAggctagctacaacgaCCCAGGCTG
td17	GGGCGGGCAggctagctacaacgaCAAGGCGCC
td18	CGGGAAGGAggctagctacaacgaTCGCCCCGG
td19	TAGTCTCAggctagctacaacgaGCGGCCCGG
td20	TCCCCGACAaggctagctacaacgaCTCCAGTCC
td21	TTTCCCCGAggctagctacaacgaACCTCCAGT
td22	TGAGCGCGAggctagctacaacgaCCTCAGTTT
td23	GGACCACAAggctagctacaacgaAGGTGGTTG
td24	CTTGGACCAggctagctacaacgaAACAGGTGG
td25	AAACTTGGAggctagctacaacgaCACAACAGG
td26	CTGATTAAAggctagctacaacgaTTGGACCAC
td27	TGGTGTCTGAggctagctacaacgaTAAACTTGG
td28	TGATGATCAggctagctacaacgaCTCTGTCTG
td29	TGGTGTGAggctagctacaacgaCATCTCTGT
td30	GCTTGGTGAggctagctacaacgaGATCATCTC
td31	ATGGGAACAggctagctacaacgaCCGCCGTCC
td32	GAATGGGAaggctagctacaacgaATCCGCCGT
td33	TGACAGGAAggctagctacaacgaGGGAACATC
td34	AGTAAATGAggctagctacaacgaAGGAATGGG
td35	CACAGTAAAggctagctacaacgaGACAGGAAT
td36	GCCCCGCCAggctagctacaacgaAGTAAATGA
td37	CCACAAACAggctagctacaacgaCCTGTAGTG
td38	GTCCACAAAaggctagctacaacgaATCCTGTAG
td39	CCACGTCCAaggctagctacaacgaAAACATCCT
td40	CCAAGACCAggctagctacaacgaGTCCACAAA
td41	CCACCAAGAggctagctacaacgaCACGTCCAC
td42	GCTGGTCCAaggctagctacaacgaCAAGACCAC
td43	GCTCTGGTAggctagctacaacgaCGCCAGTGG
td44	CTGCACCCAggctagctacaacgaTTGCCGCTC
td45	CACACTGCAggctagctacaacgaCCACTTGCC
td46	CTTTCCAAGgctagctacaacgaTGCACCCAC
td47	GCCTTTCCAaggctagctacaacgaACTGCACCC
td48	TTCTTGGCAggctagctacaacgaGCTGCCCTC

Name	DNAzyme Sequenz
TD49	GTGGACGTAggctagctacaacgaAGGCGGTTT
TD50	CCGGGTGGAggctagctacaacgaGTACAGGCG
TD51	CCTGGCGCAggctagctacaacgaCCAGTGCGC
TD52	CAAAATGAAAggctagctacaacgaTTCCTGGCG
TD53	TTTCCCAAaggctagctacaacgaGAAACTTCC
TD54	ATTGTTGGAggctagctacaacgaGCCCCCTTG
TD55	TGGGTCACAggctagctacaacgaTGTGGACG
TD56	TCTGGGTCAggctagctacaacgaATTGTTGGA
TD57	GCACAATCAggctagctacaacgaCTGGGTCAC
TD58	GGAGCACAAggctagctacaacgaCATCTGGGT
TD59	ACTGGAGCAggctagctacaacgaAATCATCTG
TD60	ATGGAGGGAggctagctacaacgaTGGAGCACA
TD61	TGGTACTTAggctagctacaacgaGGAGGGACT
TD62	GGGCTGGTAggctagctacaacgaTTATGGAGG
TD63	TCAACGATAggctagctacaacgaGCAGCCGGG
TD64	CCTCAACGAggctagctacaacgaATGCAGCCG
TD65	TCACCTCAAggctagctacaacgaGATATGCAG
TD66	CGTCGTTCAggctagctacaacgaCTCAACGAT
TD67	GTAAAGATAggctagctacaacgaGCGTGTGG
TD68	AAGTAAAGAggctagctacaacgaATGCGTGTT
TD69	GGCAATGAaggctagctacaacgaTGGGTTTCT
TD70	TCACGGCAAggctagctacaacgaGAACTGGGT
TD71	AGGCAGTCAggctagctacaacgaGGCAATGAA
TD72	ATCTCGGCAggctagctacaacgaTCTGGTAGG
TD73	GCTGAGTAAggctagctacaacgaCTCGGCATT
TD74	TATTATCAAggctagctacaacgaTTTCAGCTG
TD75	GGGTTATTAggctagctacaacgaCAATTTTCA
TD76	AAGGGGTTAggctagctacaacgaTATCAATTT
TD77	CTCCCGGAaggctagctacaacgaCCTTTGGCA
TD78	GTACATGGAggctagctacaacgaTCAAAGTTC

Fig. 8

Multiple Sequenz Alignments T-bet

Seq_1	1	CGCCCCGCTCGACAGGAAGCCCGAGAGCTGCCCGCGCCTGCCCGACGAGCGCCTAGAAG	60
Seq_2	1	CGCCCCGCTCGACAGGAAGCCCGAGAGCTGCCCGCGCCTGCCCGACGAGCGCCTAGAAG	60
Seq_1	61	CCAGCCCTCAGACCCCGGGCTCGGGTGGGTTCCCCACCGGGCTCCCTCCCCCGCC	120
Seq_2	61	CCAGCCCTCAGACCCCGGGCTCCCGTGGGTTCCCCACCGGGCTCCCTCCCCCGCC	120
Seq_1	121	CCTGCTCCCTGCCCATCCCAAGCCACGCCACCTCTCGCGCGCGAGCGCGGGTCTCTCG	180
Seq_2	121	CCTGCTCCCTGCCCATCCCAAGCCACGCCACCTCTCGCGCGCGAGCGCGGGTCTCTCG	180
Seq_1	181	ACGGCTACGGGAAGGTGCCAGCCCGCCCGGATGGGATCGTGGAGCCCGCTTGGCGAGA	240
Seq_2	181	ACGGCTACGGGAAGGTGCCAGCCCGCCCGGATGGGATCGTGGAGCCCGCTTGGCGAGA	240
Seq_1	241	CATGCTGACGGGACCGAGCGATGCCGGGAGCGACGAGGCGCGCCCTGGCGCCGA	300
Seq_2	241	CATGCTGACGGGACCGAGCGATGCCGGGAGCGACGAGGCGCGCCCTGGCGCCGA	300
Seq_1	301	CCCGCAGCACTCGCTACTTCTACCCGGAGCCCGCGCGAGGACCGGACGAGCGTCCCG	360
Seq_2	301	CCCGCAGCACTCGCTACTTCTACCCGGAGCCCGCGCGAGGACCGGACGAGCGTCCCG	360
Seq_1	361	GGGCGGACAGCTGGGGTCTCTCTACCCGGGGCGCGCTTGGTCCCCCGCCCGAGCCG	420
Seq_2	361	GGGCGGACAGCTGGGGTCTCTCTACCCGGGGCGCGCTTGGTCCCCCGCCCGAGCCG	420
Seq_1	421	CTTCTTGAGCCTACGCTACCGCGCGGACCCAGCGGCGCGCTTCCCGCGCGCGG	480
Seq_2	421	CTTCTTGAGCCTACGCTACCGCGCGGACCCAGCGGCGCGCTTCCCGCGCGCGG	480
Seq_1	481	CGAGTCTCTCCCGCCCGCCCGGACCGCGAGGCTACAGCCGGGCGAGGGCTACGCTCG	540
Seq_2	481	CGAGTCTCTCCCGCCCGCCCGGACCGCGAGGCTACAGCCGGGCGAGGGCTACGCTCG	540
Seq_1	541	CCCGGACCCCGCCCGCGGGCTCTACCCGGGGCGCGCTGAGGACTACCGCTACCCCGGG	600
Seq_2	541	CCCGGACCCCGCCCGCGGGCTCTACCCGGGGCGCGCTGAGGACTACCGCTACCCCGGG	600
Seq_1	601	ACTGAGGTGTGCGGGAACTGAGGGTCTCGGCTCAACAACCACTGTTGTGGTCCAAGT	660
Seq_2	601	ACTGAGGTGTGCGGGAACTGAGGGTCTCGGCTCAACAACCACTGTTGTGGTCCAAGT	660
Seq_1	661	TAATCAGCACCAGACAGAGATGATCATCACCAAGCAGGGACGGCGGATGTTCCCATTCCT	720
Seq_2	661	TAATCAGCACCAGACAGAGATGATCATCACCAAGCAGGGACGGCGGATGTTCCCATTCCT	720
Seq_1	721	GTCATTACTGTGCGCGGGCTGGAGCCACAGCCACTACAGGATGTTTGTGGACGTGGT	780
Seq_2	721	GTCATTACTGTGCGCGGGCTGGAGCCACAGCCACTACAGGATGTTTGTGGACGTGGT	780
Seq_1	781	CTTGTGGACAGCACCCTGCGGCTACAGAGCGCGAGTGGGTCCACTGTGGAAGGC	840
Seq_2	781	CTTGTGGACAGCACCCTGCGGCTACAGAGCGCGAGTGGGTCCACTGTGGAAGGC	840
Seq_1	841	CGAGGGCAGCATGCCAGGAACCGCCTGTACCTCCACCGGACTCCCCAACACAGGAC	900
Seq_2	841	CGAGGGCAGCATGCCAGGAACCGCCTGTACCTCCACCGGACTCCCCAACACAGGAC	900
Seq_1	901	GCACTGCATGCGCCAGGAAGTTTCATTTGGGAACTAAAGCTCACAAACAACAGGCGC	960
Seq_2	901	GCACTGCATGCGCCAGGAAGTTTCATTTGGGAACTAAAGCTCACAAACAACAGGCGC	960
Seq_1	961	GTCACCAATGTGACCCAGATGATTCTGCTCCAGTCCCTCCATAAGTACCAGCCCGGCT	1020
Seq_2	961	GTCACCAATGTGACCCAGATGATTCTGCTCCAGTCCCTCCATAAGTACCAGCCCGGCT	1020
Seq_1	1021	GCATATCGTTGAGGTGAACGACCGAGCCAGAGGCGAGCTTCAACCGCTTCCAAACGCA	1080
Seq_2	1021	GCATATCGTTGAGGTGAACGACCGAGCCAGAGGCGAGCTTCAACCGCTTCCAAACGCA	1080
Seq_1	1081	TATCTTTACTTTCCAGCAACCGAGTTCATTTGGGCTGACTGCCTACCAGAAATGCCGAGAT	1140
Seq_2	1081	TATCTTTACTTTCCAGCAACCGAGTTCATTTGGGCTGACTGCCTACCAGAAATGCCGAGAT	1140
Seq_1	1141	TACTCAGCTGAAATTTGATAAATACCCCTTTGCCAAAGGATTCGGGAGAACTTTGACTC	1200
Seq_2	1141	TACTCAGCTGAAATTTGATAAATACCCCTTTGCCAAAGGATTCGGGAGAACTTTGACTC	1200
Seq_1	1201	CATGTACACATCTGTTGACACGACATCCCTCCCCCGCTGGACCCAACTGTCAATTCCT	1260
Seq_2	1201	CATGTACACATCTGTTGACACGACATCCCTCCCCCGCTGGACCCAACTGTCAATTCCT	1260
Seq_1	1261	TGGGGGAGATCACTACTCTCTCTCTACCCAAACAGTATCTGTTCCCGAGCCGCTTCTA	1320
Seq_2	1261	TGGGGGAGATCACTACTCTCTCTCTACCCAAACAGTATCTGTTCCCGAGCCGCTTCTA	1320
Seq_1	1321	CCCCGACCTTCTCTCGCCAGGCGAAGGATGTGCTTCCCGAGGCTTACTGGCTGGGGCCCC	1380
Seq_2	1321	CCCCGACCTTCTCTCGCCAGGCGAAGGATGTGCTTCCCGAGGCTTACTGGCTGGGGCCCC	1380
Seq_1	1381	CCGGGACACAGCTATGGGGCTGACTTTGAGCAGTCACCATGAAGCTGCATTCTTGCC	1440
Seq_2	1381	CCGGGACACAGCTATGGGGCTGAGTTTCCACAGTCAGCATGAAGCTGCATTCTTGCC	1440

Seq_1	1441	CTCTGCCCTGGG <u>CCACCATGTCTACTACCG</u> AGGUCAGGAGGTCTGCCACCTGGAGC	1500
Seq_2	1442	CTCTGCCCTGGGCCCACCATCTCCTACTACCGAGGCTAGGAGGTCTGGCACCTGGAGC	1500
Seq_1	1501	TGGCTGGCTGTGGCACCCAGTACCTCCCAAGATGGGCCCAGGCTGGTTCCCCC	1560
Seq_2	1501	TGGCTGGCTGTGGCACCCAGTACCTCCCAAGATGGGCCCAGGCTGGTTCCCCC	1560
Seq_1	1561	TATGCGGACTCTCCCCATGGAACCGGCCCCGGAGGCTCAGAGGGACGGGACCAGAGGA	1620
Seq_2	1561	TATGCGGACTCTGCCCATGGAACCGGCCCCGGAGGCTCAGAGGGACGGGACCAGAGGA	1620
Seq_1	1621	CCAGGGTCCCCCTTGGTGTGGACTGAGATTGCCCCATCCGGCCCGAATCCAGTGATTC	1680
Seq_2	1621	CCAGGGTCCCCCTTGGTGTGGACTGAGATTGCCCCATCCGGCCCGAATCCAGTGATTC	1680
Seq_1	1681	AGGACTGGGCGAAGGAGACTCTAAGAGAGGCGCTGTCCCCCTATCCTTCCAGTGGTGA	1740
Seq_2	1681	AGGACTGGGCGAAGGAGACTCTAAGAGAGGCGCTGTCCCCCTATCCTTCCAGTGGTGA	1740
Seq_1	1741	CAGCTCTCTCCCTGTGGGGCCCCCTTCCTTTTGATAAGGAGCTGAAGGACAGTTTTA	1800
Seq_2	1741	CAGCTCTCTCCCTGTGGGGCCCCCTTCCTTTTGATAAGGAGCTGAAGGACAGTTTTA	1800
Seq_1	1801	TAACATATTTCCCAACTGAGCAGATGACATGATGAAGGAACAGAACAGTGTATTAGG	1860
Seq_2	1801	TAACATATTTCCCAACTGAGCAGATGACATGATGAAGGAACAGAACAGTGTATTAGG	1860
Seq_1	1861	TTGGAGGACACCGACTAATTTGGGAAACGGATGAAGGACTGAGAAGGCCCGGCTCCCTC	1920
Seq_2	1861	TTGGAGGACACCGACTAATTTGGGAAACGGATGAAGGACTGAGAAGGCCCGGCTCCCTC	1920
Seq_1	1921	TGGCCCTTCTCTGTCTTGTAGTAGTTCGTTGGGGAGGTGGGGCTCAAGAAGGATTTGGGGTT	1980
Seq_2	1921	TGGCCCTTCTCTGTCTTGTAGTAGTTCGTTGGGGAGGTGGGGCTCAAGAAGGATTTGGGGTT	1980
Seq_1	1981	CACCAGATGCTTCTTGGCCCCAGATGAAACCTGAGAGGGGTGTCCCTTGGCCCCATCCTC	2040
Seq_2	1981	CACCAGATGCTTCTTGGCCCCAGATGAAACCTGAGAGGGGTGTCCCTTGGCCCCATCCTC	2040
Seq_1	2041	TGCCCTAACTACAGTCCTTTACCTGGTGTCTGCTTCTCTTTTGGTTTCCAGCTGGAGAA	2100
Seq_2	2041	TGCCCTAACTACAGTCCTTTACCTGGTGTCTGCTTCTCTTTTGGTTTCCAGCTGGAGAA	2100
Seq_1	2101	AAGAACACAAGAAAGTCTTGCCCATGAAGGAGCTTTTGCATCTACTGGGTGGGAGGGGT	2160
Seq_2	2101	AAGAACACAAGAAAGTCTTGCCCATGAAGGAGCTTTTGCATCTACTGGGTGGGAGGGGT	2160
Seq_1	2161	CAGGTGTGGGACATGGGAGCAGGAGACTCCACTTTCTTCTTTGTACAGTAACCTTCAAC	2220
Seq_2	2161	CAGGTGTGGGACATGGGAGCAGGAGACTCCACTTTCTTCTTTGTACAGTAACCTTCAAC	2220
Seq_1	2221	CTTTTCGTTGGCATGTGTCTTAATCCCTGATCCAAAGAACAATAACACGTATGTTATA	2280
Seq_2	2221	CTTTTCGTTGGCATGTGTCTTAATCCCTGATCCAAAGAACAATAACACGTATGTTATA	2280
Seq_1	2281	ACCATCAGCCCGCCAGGGTCAGGSAAGGACTCACCTGACTTTGGACAGCTGGCCTGGGC	2340
Seq_2	2281	ACCATCAGCCCGCCAGGGTCAGGSAAGGACTCACCTGACTTTGGACAGCTGGCCTGGGC	2340
Seq_1	2341	TCCCCCTGCTCAAACACAGTGGGGATCAGAGAAAGGGGCTGCAAGGGGGGAATGGCCC	2400
Seq_2	2341	TCCCCCTGCTCAAACACAGTGGGGATCAGAGAAAGGGGCTGCAAGGGGGGAATGGCCC	2400
Seq_1	2401	ACATCTCAAGAAGCAAGATATTGTTTGTGGTGGTTGTGTGGGTCTCTGTTTTTCTTT	2460
Seq_2	2401	ACATCTCAAGAAGCAAGATATTGTTTGTGGTGGTTGTGTGGGTCTCTGTTTTTCTTT	2460
Seq_1	2461	TTCTTTCTTTTATTTTATTTTGAATGGGGAGGCTATTTATTGTACTGAGAGTGGTGTCT	2520
Seq_2	2461	TTCTTTCTTTTATTTTATTTTGAATGGGGAGGCTATTTATTGTACTGAGAGTGGTGTCT	2520
Seq_1	2521	GGATATATTCCTTTTGTCTTCATCACTTTCTGAAATAAACATAAAACGTAAAAAAA	2580
Seq_2	2521	GGATATATTCCTTTTGTCTTCATCACTTTCTGAAATAAACATAAAACGTAAAAAAA	2580
Seq_1	2581	AAAAAAAA	2589
Seq_2	2581	AAAAAAAA	2589

CGGCCCCGCTGGAGAGGAAGCCCCGAGAGCTGCCGCGCGCCTGCCGGACGAG
 GGGCTAGTAGCCAGGCGTCAGAGCCCGGGCTCCGGTGGGGTCCCCACCC
 GGGCTTCGGGTCCCCCGCCCCCTGCTCCCTGCCCATCCCAGCCCCACGCGA
 CCTTCTCGCGCGCGGAGGGGCGGGTCTCTCGACGCTACGGGAAGGTGCCA
 GCCCCCCCCGGATGGCCATCGTGGAGCCGGGTGCCGGACACATGCTGACG
 GGCACUGAGCCGATGCCGGGAGCGACGAGGGCCGGCGCCCTGGCGCCGA
 CCCCAGACCCGCTACTTCTACCCGGAGCCGGCGCGCAGGACGCGGACG
 AGCGTCTGCGGGGGCGGCGAGCCTGGGGTCTCCCTACCCGGGGGGCGCCTTG
 GTGCCCGCCCCCGGAGCCGCTTCCCTTGAGGCTACGCTTACCCGCGCGG
 ACCCCAGGCGCGCGGCTTCCCGGGCGCGGGCGACTCCTTCCCGCGCGCGG
 CGGACGCGGAGGGCTACCCAGCCGGGCGAGGGCTACGCCGCCCGGACCCG
 CGCGCCGGGCTCTACCCGGGGCGCGGTGAGGACTACCCGCTACCCGCGGG
 ACTGGAGGTGTGGGGAACTCAGGGTCCGCGTCAACACCCACCTGTTGT
 GGTCCAAGTTTAAATCAGCACCAGACAGAGATGATCATCACCAAGCAGGGA
 CGCGGGATGTTCCCATTTCCCTGTCTATTACTGTGGCCGGGCTGGAGCCAC
 CAGCCACTACAGGATGTTTGTGGACGTGGTCTTGGTGGACAGCAGCACT
 GCGGGTACAGAGCGGCAAGTGGGTGCAGTGTGGAAGGCGGAGGGCAGC
 ATGCCAGGAACCGCCTGTACGTCCACCCGACTCCCCCAACACAGGAGC
 GCACTGGATGCGCGAGGAAGTTTCATTTGGGAACTAAAGCTCAAAACA
 ACAGGGGGCGTCCAACTATGTGACCCAGATGATGTGCTCCAGTCCCTC
 CATAGTACCAGCCCGGCTGCATATCGTTGAGGTGAACGACGGAGAGCC
 AGAGGCAGCCTGCAACGCTTCCAAACACGCATATCTTACTTTCCAGAAA
 CCCAGTTTCATTGCGGTGACTGCTTACCAGAAATGCCGAGATTACTCAGCTG
 AAAATTCATAATAACCCCTTTCGCAAGGATTCCGGGAGAACTTTGATC
 CATGTACACATCTGTTGACACCAGCATCCCTCCCCGCTGGACCCAACT
 GTCAATTCCTTGGGGGAGATCACTACTCTCTCTCTACCCAACCACTAT
 CCTGTTCCCGCGCTTCTTACCCGACCTTCTTGGCCACCGGAAGGTGCT
 GGTTCGCCAGGCTTACTGGCTGGGGGCCCCCGGACCAAGCTAGGAGG
 CTGAGTTTCCAGCATCAGCATGAAGCCTGCATTCTTGCCCTCTGCCCT
 GGGCCACCATGTTCTACTACCGAGGCCAGGAGTCTTGGCACCTGGAGC
 TGGCTGGCCTGTGGCACCCAGTACCCTCCCAAGATGGGGCCGGCCAGCT
 GGTTCGCCCTATGCGGACTCTGCCATGGAACCCGCGCCTGGAGCCTCA
 GAGGACCGGGGACAGAGGACCAAGGCCCCCTTGGTGTGGACTGAGAT
 TGCCCCATCCGGCCGGAACCACTCATTCAGGACTGGGCGAAGGAGACT
 CTAGAGGAGGCGCGTGTCCCCCTTCTCTTCCAGTGGTGCAGCTCCTCC
 CCTGCTGGGGCCCCCTTCTCTTTTGAAGGAAGCTGAAGGACAGTTTFA
 TAACATTTTCCCAACTGAGCAGTGCATGATGAAGGAACAGAAACAG
 TGTATATAGGTGGAGGACACCGACTAATTTGGGAACGGATGAAGGACT
 GAGAGGCCCCCGCTCCCTCTGGCCCTTCTCTGTTAGTAGTTGGTTGGG
 GAAGTGGGGCTCAAGAAGGATTTTGGGCTCACCAGTGGCTTCTTGGCCC
 ACGATGAAACCTGAGAGGGGTCTCCCTTCCCCCATCCTCTGCCCTAACT
 ACAGTGGTTACCTGGTGGCTGCTTCTTGGCTTTTGGTTTCCAGCTGGAGAA
 AAGAAGACAAGAAAGTCTTGGGCTGAACGACCTTTTGCATCTAGTGGG
 TGGGAGGGCTCAGCTGTGGGACATGGGACAGGAGACTCCACTTTCTTCC
 TTTGTACAGTAACCTTCAACCTTTTCTTGGCATGTCTGTATCTCCCTCA
 TCCAAAAGAACAAATACACGTATGTTATAACCATCAGCCCGCCAGGCTC
 AGGGAAAGGACTCACCTGACTTTGGACAGCTCGCCTGGGCTCCCCCTGCT
 CAAACACAGTGGGGTTCAGAGAAAAGGGGCTGGAAAGGGGGAAAGGGCCC
 ACATCTCAAGAAGCAGAAATTTTGTGGTGGTGTGTGTGGGTGTGTG
 TTTTTTTTCTCTTTTCTTTTATTTTGTGAATGGGGAGGCTATTTA
 TTGTACTGAGAGTGGTGTCTGGATATACTCTTTTGTCTTCATCACTTTC
 TGAAATTAACATAAACTGTAAAAA

Fig. 8A

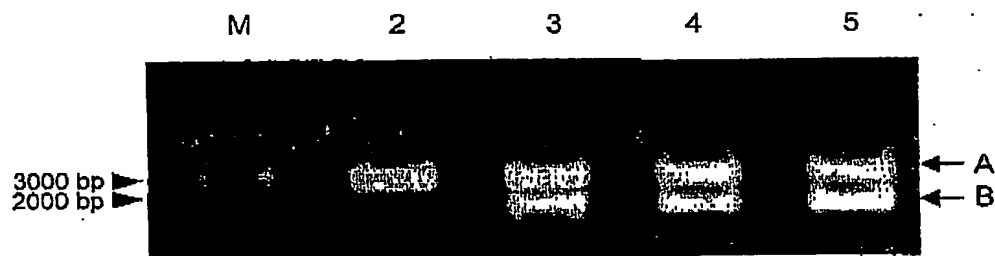


Fig. 9

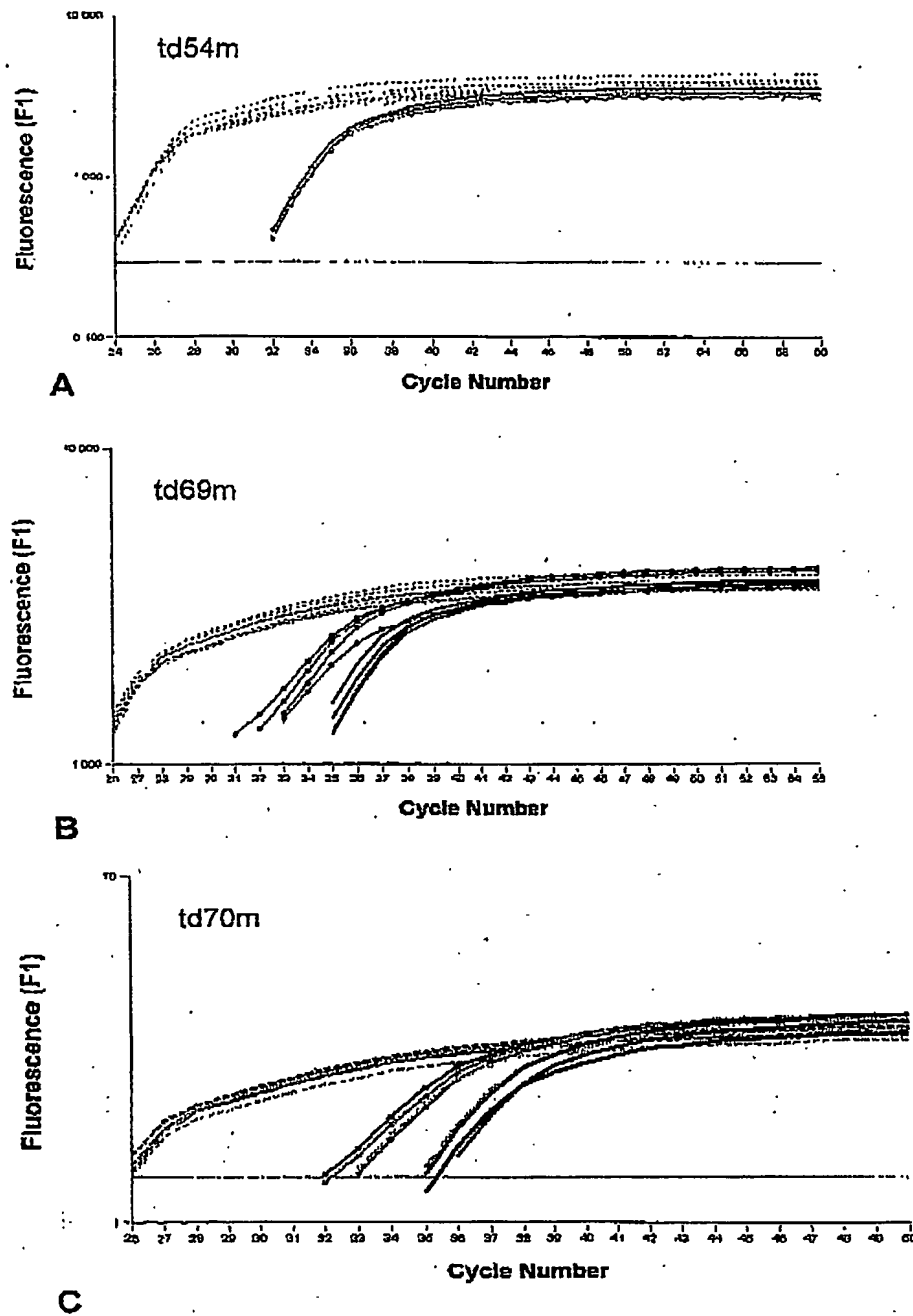


Fig. 10

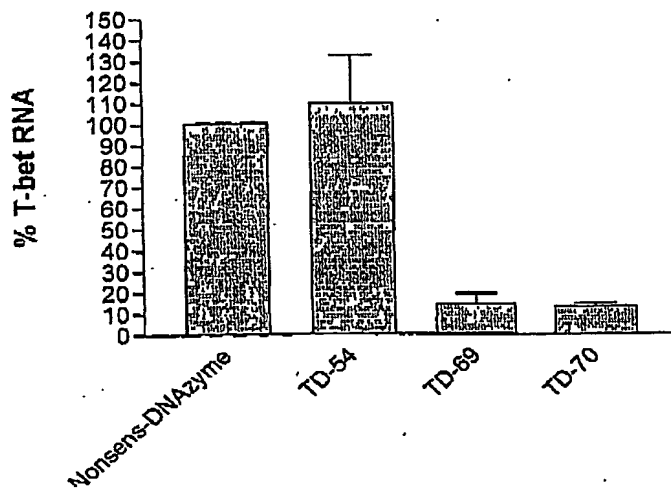


Fig. 11

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.